

ZUR PROBLEMATIK
DES MYKOTOXINNACHWEISES
IN MISCHFUTTER

Dagmar I. Kahlau

1973

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten
der Tiere der Universität München
Abteilung für Bakteriologie und Mykologie
Vorsteherin: Prof. Dr. B. Gedek

ZUR PROBLEMATIK DES MYKOTOXINNACHWEISES
IN MISCHFUTTER

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dagmar I. Kahlau
aus Meißen

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München



Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Prof. Dr. B. Gedek
Korreferent: Prof. Dr. G. Terplan

Tag der Promotion: 23. Februar 1973

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1 Dünnschichtchromatographische Nachweisbarkeit von Mykotoxinen	3
2.1.1 Aflatoxine	4
2.1.2 Ochratoxine	9
2.1.3 Sterigmatocystin	10
2.1.4 Rubratoxine und Byssochlaminsäure	11
2.1.5 Fusarientoxine	13
2.1.6 Toxine verschiedener Stoffklassen	14
2.2 Beeinflussung der Testergebnisse, speziell beim DC-Aflatoxin B ₁ -Nachweis, durch verschiedene Faktoren	22
2.2.1 Physikalisch-chemische Vorgänge	23
2.2.2 Mikrobielle Stoffwechselvorgänge	26
2.2.3 Metabole Prozesse des Tierkörpers	28
2.2.4 Andere Aflatoxine	30
2.2.5 Aflatoxin B ₁ -vortäuschende Metaboliten von Schimmelpilzen	33
2.2.6 Aflatoxin B ₁ -vortäuschende Verbindungen anderer Herkunft	37
2.2.6.1 Vorkommen in Auszügen von Futter- mittelrohstoffen und Mischfutter	37
2.2.6.2 Vorkommen in Extrakten von Lebens- und Genußmitteln	42
2.2.7 Antioxydantien	44
3. Eigene Untersuchungen	52
3.1 Experimente zur Nachweisbarkeit von Mykotoxinen mit Hilfe empfindlicher Bakterienstämme als Test- organismen	52
3.1.1 Prüfung von Reinsubstanzen in Mischfutter zu erwartender Mykotoxine im Agar-Lochtest	52
3.1.1.1 Material und Methodik	52
3.1.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung	55
3.2 Testung von aus Mischfutter hergestellten Extrakten mit unterschiedlichen Verfahren	61

	Seite
3.2.1 Material	61
3.2.2 Methoden	74
3.2.3 Ergebnisse und deren Besprechung	78
3.2.3.1 Kontaktmethode (Abklatsch- oder Reprint-Verfahren)	78
3.2.3.2 "Umgekehrte" Direktmethode	78
3.2.3.3 Direktmethode	79
3.2.3.4 Agar-Lochtest	82
3.3 Experimente zur Verbesserung der Identifizierung von im Mischfutter anzutreffenden, nicht von Toxin- bildnern herrührenden Substanzen	88
3.3.1 Überprüfung der dünn-schichtchromatographi- schen Erfassung von Antioxydantien, ins- besondere von Ethoxyquin	88
3.3.1.1 Material und Methodik	88
3.3.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung	91
3.3.2 Testung der Cytotoxizität des Ethoxyquin mit biologischen Mykotoxinnachweisverfahren	96
3.3.2.1 Hühnerembryotest	96
3.3.2.1.1 Durchführung des Ver- fahrens	96
3.3.2.1.2 Resultate und deren Interpretation	97
3.3.2.2 Zellkulturtest	98
3.3.2.2.1 Beschreibung der ange- wandten Technik	98
3.3.2.2.2 Resultate und deren Interpretation	98
3.3.3 Untersuchung der antibiotischen Aktivität des Ethoxyquin im Agar-Lochtest	99
3.3.3.1 Anwendung des Lochtestes	99
3.3.3.2 Ergebnisse und deren Besprechung	100
3.4 Experimente zur Charakterisierung eines noch nicht näher definierten Aflatoxin B ₁ -vortäuschenden mikro- biellen Stoffwechselproduktes	102
3.4.1 Nachweis der Bildung des Stoffes durch be- stimmte Schimmelpilze	102
3.4.1.1 Material und Methodik	102

	Seite
3.4.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung	104
3.4.2 Versuche zur Erzielung einer dünn-schicht- chromatographisch von Aflatoxin B ₁ zu tren- nenden Darstellung des Stoffes	114
3.4.2.1 Eindimensionale Auftrennung	114
3.4.2.1.1 Angewandte Technik	114
3.4.2.1.2 Resultate und deren Interpretation	114
3.4.2.2 Zweidimensionale Auftrennung	117
3.4.2.2.1 Angewandte Technik	117
3.4.2.2.2 Ergebnisse und deren Besprechung	117
3.4.3 Prüfung des Stoffes auf seine Zugehörigkeit zu den Mykotoxinen	119
3.4.3.1 Untersuchung von Eluaten im Hühner- embryotest	119
3.4.3.1.1 Durchführung des Ver- fahrens	119
3.4.3.1.2 Resultate und deren Interpretation	120
3.4.3.2 Untersuchung von Eluaten auf Mäuse- toxizität	120
3.4.3.2.1 Applikationsformen	120
3.4.3.2.2 Ergebnisse und deren Besprechung	122
3.4.3.3 Untersuchung von Eluaten auf Cyto- toxizität gegenüber Epithelzellen tierischer Gewebe	123
3.4.3.3.1 Beschreibung der beim Zellkulturtest ange- wandten Technik	123
3.4.3.3.2 Resultate und deren Interpretation	124
3.4.3.4 Überprüfung der antibiotischen Aktivität von Eluaten im Agar- Lochtest	126
3.4.3.4.1 Anwendung des Lochtestes	126
3.4.3.4.2 Ergebnisse und deren Besprechung	126

4. Diskussion	Seite 128
5. Zusammenfassung	137
6. Literaturverzeichnis	141
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Verderbniserregende Schimmelpilze und andere, auf Pflanzen parasitierende Pilzarten bilden Stoffwechselprodukte, die nach oraler Aufnahme im Tierkörper Krankheiten hervorrufen (WOGAN, 1965; MOREAU, 1968; REISS, 1968 a und b; GOLDBLATT, 1969). Da diese heute allgemein unter dem Begriff Mykotoxine geführten Stoffe sich in Bezug auf ihre Giftigkeit gegenüber dem tierischen Organismus vor allem durch hohe Haemo-, Hepato-, Nephro- und Neurotoxizität auszeichnen und von ihnen auch teratogene, karzinogene und östrogene Wirkungen bekannt geworden sind, besteht im Hinblick auf die Gesunderhaltung unserer Tierbestände die zwingende Notwendigkeit einer Erfassung dieser Gifte im Futtermittel. Diese ist aber noch keineswegs gewährleistet (JOST und NICOLET, 1969).

Hierfür ist nicht nur die Vielzahl in Frage kommender toxischer Metaboliten verantwortlich zu machen, sondern auch die Schwierigkeit, mit einem Verfahren mehrere Toxine gleichzeitig nachweisen zu können und Störfaktoren weitgehend auszuschließen. Sowohl das eine als auch das andere gestaltet die Bearbeitung eines Mischfutters als besonders problematisch: Setzt es sich doch aus sehr verschiedenartigen Rohstoffkomponenten zusammen, wovon jede für sich unterschiedlich mykotoxinhaltig sein kann, und weist es doch gleichzeitig eine große Vielfalt an Stoffen auf, welche den Nachweis erschweren (MOTZ und SCHULTZ, 1968).

Da eine Untersuchung auf Mykotoxine in der Regel erst dann erfolgt, wenn bereits ein Schaden aufgetreten ist, und die Einzelkomponenten eines Mischfutters beim Hersteller nicht mehr vorhanden sind, konzentrieren sich die mykotoxikologischen Nachweise im wesentlichen auf diese Art von Futtermitteln (GEDEK, B., 1969 und 1970).

Es erwies sich somit als erforderlich, bekannte Verfahren der dünn-schichtchromatographischen Analyse weiter auszubauen und sie hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten bei der Mischfutterdiagnostik zu überprüfen. Es sollte außerdem im Rahmen dieser Arbeit erprobt werden, ob und inwieweit es möglich ist, dünn-schichtchromatographische Verfahren mit mikrobiologischen Methoden zu kombinieren. Unter Umständen gelingt es, mit Hilfe von

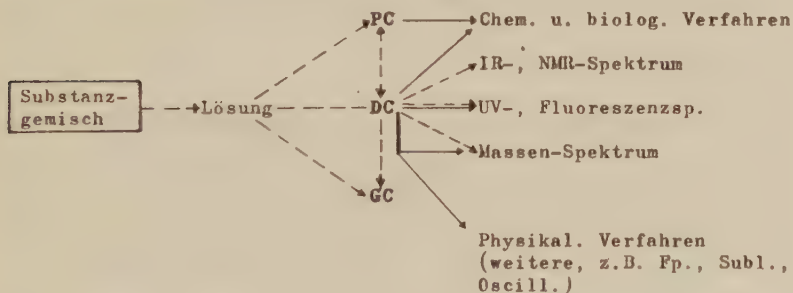
Bakterien als Testorganismen den bisherigen Aussagewert physikalisch-chemischer Verfahren zu erhöhen und auf diese Weise die Erfassung mehrerer Toxine nebeneinander zu verwirklichen, denn von der Mehrzahl aller Mykotoxine ist auch eine antibiotische Aktivität gegenüber Mikroorganismen zu erwarten (MILLER, 1961; BILAI, 1963).

2. SCHRIFTTUM

2.1 Dünnschichtchromatographische Nachweisbarkeit von Mykotoxinen

Bereits vor über 25 Jahren wurden das Prinzip und die Verwendungsmöglichkeiten der Dünnschichtchromatographie (DC) beschrieben. Für die analytische Chemie ist sie aber erst in den letzten Jahren zum "Allgemeingut" geworden (STAHL, 1967).

Die Dünnschichtchromatographie hat sich als ein sehr geeignetes Trenn- und Nachweisverfahren für die unterschiedlichsten chemischen Stoffgemische erwiesen, wie z.B. für Harze, Balsame, aliphatische Lipide, Steroide, Alkaloide, Vitamine, synthetische Arzneistoffe oder Antibiotika. Es ist deshalb naheliegend, daß auch die Mykotoxinforschung nicht auf sie verzichten kann; insbesondere deswegen, da die Dünnschichtchromatographie nicht allein der optischen Darstellung der Stoffe dient, sondern zugleich Ausgangspunkt weiterer Verfahren ist (s. Abb. 1).



Direkte Kopplung = ==>; mechan. Transfer = - - ->

Abb. 1: Ein Beispiel für die Kombination von Chromatographie und anderen Verfahren in Parallel- und / oder Hintereinanderschaltung (nach STAHL, 1967)

Bei den Mykotoxinen handelt es sich um Produkte des Pilzstoffwechsels, die sehr unterschiedlichen Stoffklassen zuzuordnen sind. Es kann sich dabei beispielsweise handeln um Cumarine,

Xanthone, Pyrane, Noanadride und Scirpene (MILLER, 1961; MEYER und LEISTNER, 1969), wie sie vornehmlich von Aspergillen, Penicillien und Fusarien gebildet werden.

Die Anwendbarkeit der Chromatographie, insbesondere der Dünnschichtchromatographie, für den Nachweis dieser Stoffe hängt von wesentlichen Voraussetzungen ab:

Es gilt als erstes die spezifischen Lösungsmittel für die einzelnen Verbindungen herauszufinden und als zweites geeignete Fließmittelsysteme und Sorptionsmittel zu ermitteln, die eine scharfe Abtrennung der Mykotoxine von Verbindungen, die beim Extraktionsvorgang nicht separiert werden konnten, zu ermöglichen. Besonders bei Untersuchungsmaterial mit hohem Fettgehalt, sowie bei jeglicher Art von Mischfutter treten Schwierigkeiten diesbezüglich auf.

So bemühte sich die Mykotoxinforschung bereits seit Jahren einerseits, immer mehr Pilzgifte auf diesem Wege zu erfassen, und andererseits, die bewährten dünnenschichtchromatographischen Verfahren laufend zu verfeinern.

Über die wichtigsten dünnenschichtchromatographischen Methoden der Mykotoxinanalyse wird im folgenden näher berichtet.

2.1.1 Aflatoxine

Aspergillus flavus, aber auch andere *Aspergillus*-Arten, sowie *Penicillium* spp. und eine *Rhizopus* sp. bilden vornehmlich Difuro-Cumarin-Verbindungen, die Aflatoxine und deren Abkömmlinge (SARGEANT et al., 1961; VAN DORP et al., 1963; CODNER et al., 1963; HODGES et al., 1964; KULIK und HOLADAY, 1967; VAN WALBEEK et al., 1968; ASAO et al., 1963 und 1965; u.a.).

Es liegen besonders zahlreiche Beschreibungen über Extraktionsverfahren zur Gewinnung dieser Mykotoxine aus unterschiedlichen Medien und die anschließende chromatographische, respektive dünnenschichtchromatographische Aufarbeitung der Extrakte vor.

IONS und GOLDBLATT (1969) faßten bewährte Methoden in Tabellen zusammen, die anschließend wiedergegeben werden (s. Tab. 1-4).

Von den verschiedenen Aflatoxinnachweisverfahren stellt die PONS et al.-Methode (1966 a) eine der empfindlichsten dar. Mengen von 1-5 ppb Aflatoxin B₁ können damit erfaßt werden.

Tabelle 1: Reinigung des Extraktes für den Aflatoxinnachweis -
Entfernung von Pigmenten und polaren Lipiden

Methode	Verfahren	Vorreinigung des Extraktes	
		Lösungsmittel ^m	Durchführung
TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE (1965)	Scheidetrichter	M : C : W	4malige Separierung
DE JONGH et al. (1964a)	Scheidetrichter	M : W : PÄ	1malige Separierung
TRAGER et al. (1964)	fortlaufend flüssig:flüssig	C : W	3 Stunden
NESHEIM (1964)	Celit-Säule	H	500 ml
ROBERTSON et al. (1965)	Scheidetrichter	A : H : Salz- lösg.	3malige Separierung
LEE (1965)	-	-	-
PONS et al. (1966a)	Bleiacetat + Scheidetrichter	C : W	2malige Separierung
EPPLEY (1966)	Kieselgel-Säule	H	150 ml

Zeichenerklärung: s.S. 7

Tabelle 2: Reinigung des Extraktes zur Abtrennung der Aflatoxine

Methode	Verfahren	Lösungsmittel ^a	Durchführung
TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE (1965)	-	-	-
DE JONGH et al. (1964a)	Scheidetrichter	M : W : C	4malige Separierung
TRAGER et al. (1964)	Scheidetrichter	M : W : PÄ	2malige Separierung
NESHEIM (1964)	Celit-Säule	C : H	600 ml
ROBERTSON et al. (1965)	Scheidetrichter	C : W	2malige Separierung
LEE (1965)	-	-	-
PONS et al. (1966a)	Kieselgel-Säule	Ä + C : M	150 + 150 ml
EPPLEY (1966)	Kieselgel-Säule	Ä + C : M	150 + 150 ml

Zeichenerklärung: s.S. 7

Tabelle 3: Unterschiedliche Auftrennungsverfahren

Methode	DC-Entwicklung			
	Sorbtionsmittel		Fließmittel ^a	Laufhöhe (cm)
	Typ	Schicht- dicke in µ		
TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE (1965)	Kiesel- gel-G	508	C : M (95:5)	10
DE JONGH et al. (1964a)	Kiesel- gel-G	300	C : M (98:2)	10
TRAGER et al. (1964)	G-HR	250	C : M (95:5)	15 ^b
NESHEIM (1964)	G-HR	250	C : M (93:7)	12-14 ^b
PONS et al. (1966a)	G-HR	500	C : M (97:3)	14 ^b
HEUSINKVELD et al. (1965)	G-HR	400	C : M : Es (95:4,5:0,5)	10 ^b
ENGEBRECHT et al. (1965)	G	250	C : A (9:1)	10-15 ^b
STOLOFF et al. (1966)	G-HR	250	B : E : W (46:35:19)	12-14 ^b
EPPLEY (1966)	G-HR	250	C : A (9:1)	12-14 ^c
PONS et al. (1968)	Adsor- bosil-1	500	C : A : P (850:125:25)	12-13 ^c

Zeichenerklärung für Tabelle 1-3:

^a M = Methanol; W = Wasser; C = Chloroform; PÄ = Petroläther;
H = Hexan; A = Aceton; Ä = Diäthyläther; Es = Essigsäure;
E = Äthanol; P = 2-Propanol; B = Benzol

^b ausgekleidete, gesättigte Kammer

^c unangekleidete, ungesättigte Kammer

Tabelle 4: Unter verschiedenen Bedingungen erzielte Rf-Werte der Aflatoxine

Fließmittel ^a	Kammerbeschaffenheit	Kieselgel G-HR-Dicke in μ	Rf-Werte der Aflatoxine Laufhöhe 12-13 cm			
			B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
C:M (97:3)	^b k	500	0,50	0,45	0,40	0,35
C:M (93:7)	^c k	250	0,41	0,37	0,30	0,28
B:E:W (46:35:19)	^c k	250	0,58	0,53	0,47	0,43
C:A (9:1)	^c k	250	0,36	0,30	0,24	0,20
C:A (9:1)	^c uk	250	0,70	0,61	0,52	0,44
C:A (85:15)	^d k	500	0,44	0,39	0,34	0,31
C:A (85:15)	^d uk	500	0,61	0,53	0,46	0,39
C:A:P (825:150:25)	^d k	500	0,54	0,48	0,42	0,37
C:A:P (825:150:25)	^d uk	500	0,73	0,66	0,59	0,52

Zeichenerklärung:

- ^a C = Chloroform; M = Methanol; B = Benzol; E = Äthanol; W = Wasser; A = Aceton; P = 2-Propanol
- ^b Daten von PONS und GOLDBLATT (1965)
- ^c Daten von EPPLEY (1966)
- ^d Daten von PONS et al. (1966b)
- k = ausgekleidet; uk = unausgekleidet

2.1.2 Ochratoxine

Aspergillus ochraceus ist der hauptproduzent der Cumarin-verbindungen Ochratoxin A, B und C (VAN DER MERWE et al., 1965), wovon das Ochratoxin A ein 7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methylisocumarin darstellt, dessen 7-carboxy-Gruppe mit einem Amid an L-B-phenylalanin gebunden ist. Ochratoxin B und C sind dagegen Dechloro-, bzw. Äthylesterderivate des Ochratoxin A.

Extrakte aus mit *A. ochraceus* verschimmeltem Maismehl (Lösungsmittel Chloroform-Methanol, 1:1) zeigen auf Kieselgel (Silica Gel)-DC-Platten aufgetragen, das Vorhandensein von Ochratoxin A, B und C unter UV-Licht als stark grüne Fluoreszenzen mit Rf-Werten von 0.57, 0.55, 0.73 an.

Wird die Chromatographieplatte in Benzol-Essigsäure (3:1) entwickelt, fluoresziert Ochratoxin A unter dem UV-Licht grün (Rf-Wert 0.5), Ochratoxin B blau-grün (Rf-Wert 0.35) und Ochratoxin C blaß grün (Rf-Wert 0.65) (STEYN und VAN DER MERWE, 1966).

SCOTT und MAND (1967) beschreiben eine Methode zum Nachweis, sowie zur semiquantitativen Bestimmung des Ochratoxin A in Mehl und anderen Getreideprodukten mit einer Empfindlichkeit von 25 ppb. Dieses Verfahren ermöglicht eine gleichzeitige Analyse im Extrakt vorhandener Aflatoxine. Nach Extraktion mit wässrigem Methanol und n-Hexan wird die zu untersuchende Probe auf Kieselgel G-HR-Platten aufgetropft und im frisch hergestellten Fließmittel Benzol-Methanol-Essigsäure (24:2:1) aufgetrennt. Die Rf-Werte der einzelnen Toxine liegen für Ochratoxin A bei 0.6, für Aflatoxin B₁ bei 0.74, für Aflatoxin B₂ bei 0.63, für Aflatoxin G₁ bei 0.52 und für Aflatoxin G₂ bei 0.43.

Zum Nachweis mykotoxinproduzierender Schimmelpilze in Lebensmitteln verwendeten VAN WALBEEK et al. (1968) Chloroform als Lösungsmittel, Kieselgel G-HR-Platten und die folgenden Laufmittel:

- a) für Aflatoxine Chloroform-Aceton (9:1), Chloroform-Methanol (93:7), die Oberphase von Benzol-Äthanol-Wasser (46:35:19) und mit destilliertem Wasser gesättigtes Äthylacetat und
- b) für Aflatoxine und Ochratoxin A Benzol-methanol-Essigsäure (24:2:1).

Auf Grund einer gewissen Ähnlichkeit der verfahrenstechnik mit

der von SCOTT und HAND (1967) lieferte der dünnsschichtchromatographische Nachweis vergleichbare Ergebnisse. Zur Absicherung eines Ochratoxin A-Nachweises kann die Behandlung des Chromatogramms mit Ammoniak herangezogen werden. Die Fluoreszenz des Toxins wechselt von Grün nach Blau.

Unter Anwendung der Methodik von SCOTT und HAND (1967) überprüften DAVIS et al. (1969) die Ochratoxin A-Produktion des *Aspergillus ochraceus* in einem halbsynthetischen Medium. Bei der Auswertung der DC-Platten bewährte sich die Ochratoxin A-Identifizierung unter kurzwelligem UV-Licht, da dieses Toxin bei 354 nm wesentlich intensiver fluoresziert als bei 366 nm. Das gleiche trifft für Ochratoxin B unter der Einwirkung von langwelligem UV-Licht zu.

Ein von CAMPBELL (1967) beschriebenes Verfahren schließlich entspricht weitgehend den bereits erörterten Methoden.

2.1.3 Sterigmatocystin

Das Xanthon Sterigmatocystin ist ein Stoffwechselprodukt der Schimmelpilze *Aspergillus versicolor* (DAVIS et al., 1960; BULLOCK und UNDERWOOD, 1962), *A. nidulans* und einer nicht weiter spezifizierten Art der Gattung *Bipolaris* (HOLZAPFEL et al., 1966 a).

Es empfiehlt sich sterigmatocystinverdächtige Proben in einem 2 % Methanol-haltigen Chloroform-Fließmittel zu trennen. Unter langwelligem UV-Licht fluoresziert das Toxin ziegelrot bei einem Rf-Wert von 0.8. Es handelt sich hierbei um eine sehr schwache Fluoreszenz. Andere, rot fluorszierende Verbindungen, die von bestimmten Getreidearten (*Sorghum*) herrühren und in den Extrakt gelangen, erschweren die Mykotoxinanalyse.

Im Vergleich zu den Aflatoxinbestimmungsverfahren zeigt die geschilderte Methode mit tausendfach geringerer Empfindlichkeit an. Die unterste Nachweisbarkeitsgrenze liegt im Falle visueller Auswertung bei 0,4 µg Sterigmatocystin (FISHBEIN und FALK, 1970). Für den Sterigmatocystinnachweis in Getreide und Ölsaaten mittels Dünnsschichtchromatographie ist jedoch eine Methode von VORSTER und PURCHASE (1968) entwickelt worden, mit welcher sogar Mengen von 0,0025 µg erfaßt werden können. Dem Verfahren liegt als Prinzip zugrunde eine vorherige Umwandlung des Toxins in ein Mono-

acetat, das auf der DC-Platte unter langwelligem UV-Licht intensiv hellblau fluoresziert.

Die oben erwähnten interferierenden, vornehmlich aus Sorghum stammenden, Stoffe können bei Anwendung der PONS et al. Methode (1966 a) zur Extraktion ausgeschlossen werden. Mit Kieselgel D-5 beschichtete DC-Platten, die für zwei Stunden bei 105°C aktiviert werden, trennen die Bestandteile der acetylierten Extrakte aus Mais und Sorghum klar auf. Als Laufmittel eignet sich Chloroform, das 0,75 % Äthanol als Stabilisator, sowie 2 % Methanol enthält. Unter UV-Licht (360 nm) fluoresziert Sterigmatocystin als hellblauer Fleck (Rf-Wert 0.6). Eine Verwechslung mit Aflatoxinen ist nicht gegeben, da diese in Chloroform mit 2 % Methanol nur eine geringe Laufhöhe erreichen.

Die Empfindlichkeit der Nachweismethode des Sterigmatocystin in Getreide liegt nach STACK und RODRICKS (1971) bei 30 µg/kg.

2.1.4 Rubratoxine und Byssoschlaminsäure

Die Rubratoxine (A und B) und die Byssoschlaminsäure stellen chemisch verwandte Verbindungen dar (MOSS et al., 1968).

Von den Rubratoxinen A und B, Noanadrid-Stoffwechselprodukte der Penicillium-Art *P. rubrum*, gilt Rubratoxin B als die toxischere Substanz (MOSS et al., 1967).

HAYES und WILSON (1968) beschreiben die Gewinnung des Rubratoxin B durch eine langwierige Ätherextraktion aus flüssigen Kulturmedien des *P. rubrum*-Stammes P-13 (NRRL A-11785). Das pH des konzentrierten Mediums muß danach auf einen Wert von 1,5 eingestellt werden. Nach anschließender Reinigung des Extraktes wird eine in Aceton gelöste Probe auf Kieselgel HF-DC-Platten aufgetropft und in einer unausgekleideten Kammer, die mit Eisessig-Methanol-Chloroform (2:20:80) gesättigt ist, aufgetrennt. Rubratoxin B erscheint auf der DC-Platte als ein Fleck mit einem Rf-Wert von 0.54-0.59, wenn die Platte sofort entwickelt wird. Wird die Platte jedoch erst einige Minuten nach der Substanzauftragung in den Tank gestellt, verschiebt sich der Rf-Wert nach 0.08-0.14. Unter kurzwelligem UV-Licht (253 nm) betrachtet, tritt das Toxin als dunkler Punkt auf grün fluoreszierendem Hintergrund hervor. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt bei 10 000 ppb.

FRANK 1969a empfiehlt Kieselgel G-Platten und als Fließmittel Äther-Dioxan (3:1), um Lubratoxin B dünnschichtchromatographisch zur Darstellung zu bringen.

Byssoschlamys fulva (Hauptfruchtform des *Paecilomyces varioti*) bildet das Stoffwechselprodukt Byssoschlaminsäure (PUT und KRNISWIJK, 1964; u.a.).

Qualitative und quantitative Bestimmungsmethoden dieser Verbindung arbeiteten SCHMIDT und REHM (1968) aus. Der dünnschichtchromatographische Nachweis der Byssoschlaminsäure in Fruchtsäften kann entweder nach Extraktion mit Chloroform oder Essigester geführt werden. In Aceton gelöste Proben trennen sich am besten bei Verwendung von Kieselgel HF₂₅₄ beschichteten DC-Platten und unter Anwendung von n-Pentanol-Ameisensäure-Wasser (20:20:1) als Fließmittel auf. Nach einundhalbstündiger Entwicklung werden die DC-Platten bei 100°C zur Entfernung des Lösungsmittels getrocknet. Die Säure weist keine Eigenfluoreszenz auf. Sie hebt sich als dunkler Fleck deutlich gegenüber der hell fluoreszierenden Platte ab (UV-Licht mit 254 nm Wellenlänge); 5 µg Byssoschlaminsäure sind noch gut erkennbar. Da der Rf-Wert der Byssoschlaminsäure zwischen 0.84-0.87 liegt, die Werte der Fruchtsaftfarbstoffe jedoch zwischen 0.45-0.77, ist eine leichte Trennung von Toxin und solchen Begleitstoffen möglich.

Ein Byssoschlaminsäurenachweis in Fetten und fetthaltigen Lebensmitteln ist dagegen weitaus schwieriger (SCHMIDT und REHM, 1969). Zur Herauslösung des Fettes ist eine vorherige Extraktion mit Petroläther, in welchem das Toxin weitgehend gelöst ist, erforderlich. Kieselgel HF₂₅₄-Platten, mit 5 %iger Paraffinlösung präpariert, halten fluoreszierende, den Nachweis störende Substanzen am Startpunkt zurück, die Byssoschlaminsäure und ähnliche, UV-Lichtabsorbierende Verbindungen wandern in 90 %igem Methanol als Bande. Diese läßt sich nach 14 Stunden langer Entwicklungszeit auf normaler Kieselgel HF₂₅₄-Platte mit einem Benzol-Essigsäure-Gemisch (3:1) als Fließmittel auftrennen, das Toxin mit dem spezifischen Rf-Wert anzeigend.

2.1.5 Fusarientoxine

Fusarium graminearum ist der Hauptproduzent eines Resorcylsäure-lactons, das als F-2 oder Zearalenone bezeichnet wird (URRY et al., 1966).

Das Vorliegen einer richtungsweisenden Methode zur Auffindung des Zearalenone in mit Fusarien verpilzten Proben ist das Ergebnis der Arbeit von MIROCHA et al. (1967). Kieselgel E-DC-Platten und das Fließmittel 5 % Äthylalkohol in Chloroform haben sich als geeignet erwiesen, F-2 abzutrennen (Rf-wert 0.5).

Bei einer großen Zahl dünnschichtchromatographischer Untersuchungen von mit Fusarien infiziertem Reis und Mais konnten MIROCHA et al. (1968) eine ganze Reihe verschiedener F-2 ähnlicher Verbindungen nachweisen.

Mit Toxin I und II bezeichnete, chemisch als 4-acetamino-4-hydroxy-2-butensäure γ -lacton und 4,15-diacetoxy-8 α -(3-methylbutyryloxy)-12,13-epoxytrichothec-9-en-3 α -ol anzusprechende Giftstoffe, die von auf Wiesenschwingel wachsenden *Fusarium* spp. gebildet werden, wiesen YATES et al. (1970) auf dünnschichtchromatographischem Wege nach. Hierzu hergestellte Äthylacetat-Extrakte ergeben, auf Kieselgel G-Platten aufgetropft und in Äthylacetat-Toluol (3:1) nach der HONEGGER-Sandwich-Methode (1963) entwickelte, nach Besprühen mit Schwefelsäure im Falle von Toxin I einen gelb-braunen bis braunen geschwänzten Fleck (Rf-Wert 0.2), von Toxin II einen ovalen grünen bis dunkelgrauen Fleck (Rf-Wert 0.6).

Das vornehmlich von *Fusarium tricinctum* und *F. equiseti* gebildete Diacetoxyscirpenol (4,15-diacetoxyscirp-9-en-3-ol) (SIGG et al., 1965; BRIAN et al., 1961) läßt sich ebenfalls erst nach Besprühen mit konz. Schwefelsäure auf den DC-Platten nachweisen (GILGAN et al., 1966).

2.1.6 Toxine verschiedener Stoffklassen

SCOTT und HAND (1967) zeigten bereits auf, daß es möglich ist, mehrere unterschiedliche Mykotoxine in einem Arbeitsgang zu erfassen und dennoch spezifische Nachweise zu führen (vgl. S. 9).

Für den Nachweis der Aflatoxine, Ochratoxine und von Zearalenone empfiehlt EPPLEY (1968) folgende Methodik:

Kieselgel-Säule mit dem Wasser-Chloroform-Extrakt beschicken; Zearalenone (= Fraktion 1) mit Aceton-Benzol (5:95), Aflatoxine (= Fraktion 2) mit Methanol-Chloroform (3:97) und Ochratoxine (= Fraktion 3) mit Eisessig-Benzol (1:9) nacheinander eluieren. Für Fraktion 2 eignet sich Aceton-Chloroform (1:9) zur dünn-schicht-chromatographischen Auftrennung. Beim dünn-schicht-chromatographischen Nachweis von Zearalenone und den Ochratoxinen ist einem Gemisch aus Eisessig und Benzol (1:9) als Fließmittel der Vorzug zu geben.

Zearalenone ist nur unter der Einwirkung von kurzwelligem UV-Licht als grünlich-blaue Fluoreszenz (Rf-Wert 0.5) feststellbar, Ochratoxin A fluoresziert dagegen bei gleichem Rf-Wert (0.5) grünlich-blau sowohl in Gegenwart von kurz- als auch von langwelligem UV-Licht. Ochratoxine B und C fluoreszieren bei Rf-Werten von 0.4 und 0.6.

Bei zearalenoneverdächtigen Proben ist es angezeigt, Fraktion 1 auf eine zweite DC-Platte aufzutropfen und eine zusätzliche Auftrennung in Äthanol-Chloroform (5:95) vorzunehmen. Die Absicherung des Nachweises von Aflatoxinen bzw. Ochratoxin A kann nach Angaben des Autors durch ergänzend dazu angewandte Verfahren erfolgen.

Bei Untersuchungen von SHOTTWELL und Mitarbeitern (1969 und 1970), bei denen der Mykotoxingehalt in Maisproben festgestellt werden sollte, wurde nach dem gleichen Prinzip vorgegangen.

In Acetonitril-Wasser (9:1), wenn diesem gesättigtes Kaliumchlorid zugesetzt ist, steht ein Extraktionsmittel zur Verfügung, welches sich nicht nur für die Aflatoxine, Ochratoxin A und Zearalenone eignet (YIN, 1969). Es werden damit auch Ochratoxin B,

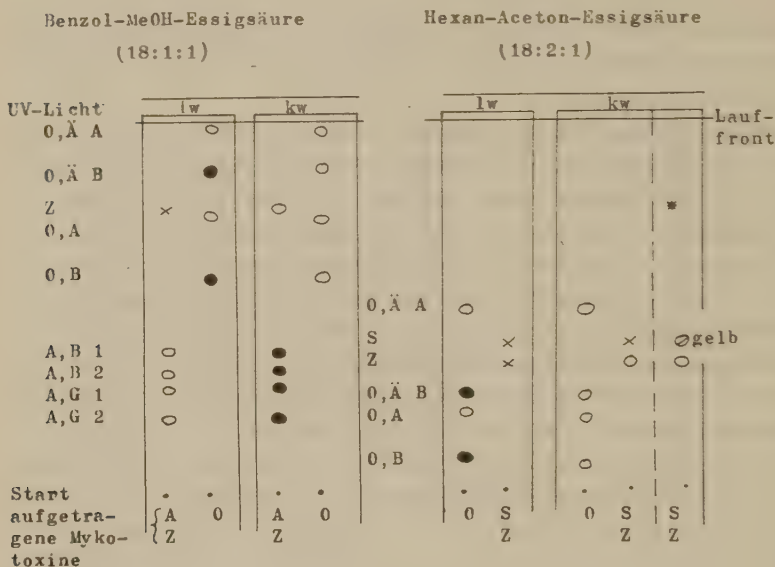
Sterigmatocystin und Patulin erfassbar (STOLOFF et al., 1971).

Um die Entwicklung eines auf dem Nachweis von Patulin, einem γ -Pyrone-Stoffwechselprodukt des Pilzes *Penicillium expansum*, abgestimmtes dünn-schichtchromatographisches Verfahren waren bereits SCOTT und SOMERS (1968), POHLAND und ALLEN (1970) und TAUCHMANN et al. (1971) bemüht.

Bei der Anwendung des Multitoxinnachweisverfahrens wird der Extrakt in üblicher Weise in Benzol-Acetonitril (98:2) aufgenommen. Für den dünn-schichtchromatographischen Nachweis der Aflatoxine, Ochratoxine und Zearalenone eignet sich das Laufmittel Benzol-Methanol-Essigsäure (90:5:5). Zur Erfassung des Sterigmatocystin ist die Verwendung des Fließmittels Hexan-Aceton-Essigsäure (90:10:5) erforderlich. Mit diesem lassen sich allerdings auch Zearalenone und Ochratoxine zur Darstellung bringen. Zur Auffindung des Patulin muß zweidimensional chromatographiert werden, nämlich zunächst in der ersten Laufrichtung mit Chloroform-Essigsäure-Athyläther (17:1:3) und daran anschließend in der zweiten Laufrichtung mit Chloroform-Aceton (9:1). Das Patulin hebt sich als dunkler Fleck von dem weiß fluoreszierenden Hintergrund der Platte ab.

Über die Rf-Werte der anderen mit der gleichen Methode erfassbaren Mykotoxine gibt Abb. 2 Auskunft.

Abb. 2: Anordnung der Mykotoxinstandards nebeneinander feststellbarer Schimmelpilzgifte im Dünnschichtchromatogramm nach STOLOFF et al. (1971)



Code: A = Aflatoxine 0 = Ochratoxine S = Sterigmatocystin
 Z = Zearalenone Ä = Äthylester
 * = Sprühreagens AlCl_3 -Lösung
 ○ = intensive blaue Fluoreszenz ● = schwache Fluoreszenz
 × = nicht sichtbar

STEYN (1969) entwickelte sogar eine Methode, die die Toxine Aflatoxin B_1 und G_1 , Ochratoxin A und B, Sterigmatocystin, Aspertoxin (vgl. RODRICKS et al., 1968 a), Zearalenone, Secalonic-Säure D (vgl. STEYN, 1970), Diacetoxyscirpenol, Hydroxy-Rosenonolacton (vgl. HOLZAPFEL und STEYN, 1968) und Cyclopiazonic-Säure (vgl. HOLZAPFEL, 1968) dünn-schichtchromatographisch zur Darstellung bringt.

Er bedient sich zur Absicherung der Identität der Toxine verschiedener Farbreaktionen, die er durch Verwendung zusätzlicher chemischer Verbindungen erhält.

Seinem Verfahren sind allerdings Grenzen gesetzt: Es zeigt vorläufig nur reine Verbindungen an und eignet sich nicht für Extrakte aus Handelsgütern.

Es werden zu diesem Verfahren mit Oxalsäure präparierte Kieselgel G-Platten benötigt, auf die die in Chloroform-Methanol (1:1) gelösten Mykotoxine aufgetragen und in Chloroform-Methylisobutylketon (4:1) entwickelt werden. Als Sprühreagenzien finden Schwefelsäure und Eisenchlorid Verwendung.

Einer Übersichtstabelle (Tab. 5) sind die verschiedenen Rf-Werte der einzelnen Toxine, sowie deren Fluoreszenzen und die unterschiedlichen Farbreaktionen nach Besprühen mit Schwefelsäure oder Eisenchlorid zu entnehmen.

Die dünnschichtchromatographische Bestimmung achtzehn verschiedener Mykotoxine (s. Tab. 6) gelang in einem Arbeitsvorgang SCOTT et al. (1970).

Die Voraussetzung dafür ist gegeben bei der Auftrennung von Extrakten auf mit Adsorbil 5 Kieselgel 0,8 mm dick beschichteten DC-Platten und der Verwendung von Toluol-Äthylacetat-90 %ige Ameisensäure = TÄA (6:3:1) und Benzol-Methanol-Essigsäure = BME (24:2:1) als Fließmittel.

Eine Auswertung des Chromatogramms hat im sichtbaren und ultravioletten Licht, sowie vor und nach Besprühen der Platten mit einer Mischung aus p-Anisaldehyd-Methanol-Eisessig-konz. Schwefelsäure zu erfolgen.

Tabelle 5: Charakteristika der mit der Methode nach STEYN (1969) erfaßbaren Mykotoxine

Mykotoxin	Fungus	Rf-Wert (x 100)	Fluores- zenz	Farbreaktion nach Einwirkung von	
				H ₂ SO ₄	FeCl ₃
Aspertoxin	A. flavus	12	hellgelb	grün-gelb	-
Ochratoxin B	A. ochraceus	20	blau	-	rot-braun
Secalonic- Säure D	P. oxalicum	23	dunkel	hellbraun	hellbraun
8α-(3-methyl- butyryloxy)- 4β,15-diacet- oxyscirp-9-en -3α-ol	F. tricinatum	28	-	bleigrau	-
Aflatoxin G ₁	A. flavus	30	grün	grün-grau	-
Aflatoxin B ₁	A. flavus	40	blau	grün-grau	-
6β-Hydroxy- Rosenono- lacton	T. roseum	44	-	orange-rot	-
Ochratoxin A	A. ochraceus	48	grün	-	rot-braun
Cyclopiazonic- Säure	P. cyclopium	65	dunkel	rot-braun	rot-braun
Zearalenone	F. gramine- arum	72	schwach blau	hellgelb	rot-braun
Sterigmato- cystin	A. nidulans A. versicolor Bipolaris sp.	85	orange	grün-grau	grün

Tabelle 6: Darstellung mehrerer Toxine mit dem dünnschicht-
chromatographischen Verfahren nach SCOTT et al. (1970)

Tabelle 6: Darstellung mehrerer Toxine mit dem DC-Verfahren

Mykotoxin	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Rf-Wert	
		Lösungsmittelsystem	
		TAA	BME
Citrinin	10	0.16-0.48 ^b	0-0.20 ^b
Luteoskyrin	1,000	0-0.47 ^b	0-0.23 ^b
Nivalenol	1,000	0-0.02 ^b	0-0.01 ^b
4-Acetamido-4-hydroxy-2-butenyl-Säure - lacton	1,000	0.10	0.03
Kojisäure	1,000	0.16	0.03
Aflatoxin G ₂	0,2	0.17	0.13
Nivalenol-Acetat	1,000	0.19	0.09
Aflatoxin G ₁	1	0.23	0.14
Aflatoxin B ₂	0,2	0.26	0.20
Aflatoxin B ₁	1	0.31	0.23
Diacetoxyscirpenol	1,000	0.33	0.24
Aspertoxin	50	0.35	0.13
T-2 Toxin	100	0.36	0.28
Patulin	200	0.41	0.21
Penicillinsäure	200	0.47	0.22
Gliotoxin	1,000	0.53	0.39
Ochratoxin A	10	0.55	0.35
Zearalenone	50	0.78	0.42
Sterigmatocystin	50	0.85	0.75

Zeichenerklärung:

- a = in Chloroform-Lösung, außer für Citrinin und Aflatoxine (in Benzol-Acetonitril, 98:2), Nivalenol (in Äthylalkohol) und Kojisäure (in Äthylacetat)
- b = Streifen
- c = vorgezogenes Nachweisverfahren

2.2 Beeinflussung der Testergebnisse, speziell beim DC-Aflatoxin B_1 -Nachweis, durch verschiedene Faktoren

Es wurde bereits in dem vorangegangenen Kapitel angedeutet, daß die Anwendung der dünnsschichtchromatographischen Verfahren in der Mykotoxindiagnostik verschiedentlich Schwierigkeiten bereitet. Die dünnsschichtchromatographische Auswertung aflatoxinhaltiger, bzw. -verdächtiger Untersuchungsproben liefern dafür ein gutes Beispiel.

Sie ergeben sich zum einen aus der Tatsache, daß es vielfach nicht gelingt, klar abgetrennte Fluoreszenzbänder, bzw. -flecke zu erhalten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß es auf der DC-Platte zu "Verschmierungen" und "Schwanzbildung" oder "Perlschnurbildung" infolge ungenügender Vorreinigung, d.h. Entfettung, der aufgetragenen Extrakte kommt (FRANK, 1969; HANSSEN und HAGEDORN, 1969). In einem ursächlichen Zusammenhang mit der sog. "Schwanzbildung" stehen auch Pigmente (gelbe bis orange), die beim Wachstum einiger *Aspergillus flavus*-Arten auf Weizen, Reis oder Mais gebildet werden, mit Hilfe von Kupferkarbonaten aber ausfällbar sind (WIESEMAN et al., 1967).

Zum anderen ist es vielfach nicht leicht zu beurteilen, ob die im gleichen Rf-Bereich wie die gesuchten Toxine auftretenden Fluoreszenzen, als solche anzusprechen sind, da Verwechslungen mit anderen Substanzen vorkommen können, die sich in einem bestimmten Fließmittelsystem ähnlich verhalten (BÖSENBERG, 1970 a).

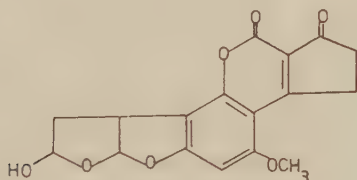
Auf die Möglichkeit einer Fehlbeurteilung soll etwas näher eingegangen werden. Es werden hierbei hauptsächlich die Faktoren besonders herausgestellt, die die quantitative Auswertung der blauen Fluoreszenz des Aflatoxin B_1 erschweren und den qualitativen Nachweis, die prinzipielle Feststellung eines Vorhandenseins von Aflatoxin B_1 in einer Probe beeinträchtigen können. In die Betrachtung soll die Erörterung von im Chromatogramm ähnlich wie Aflatoxin B_1 in Erscheinung tretender Fluoreszenzen, deren stoffliche Natur z.T. noch unbekannt ist, einbezogen werden, und Faktoren Erwähnung finden, die ihrerseits ein Mykotoxinbestimmungsergebnis verfälschen können.

2.2.1 Physikalisch-chemische Vorgänge

BÖSENBERG (1970 b) vermutet in der chemischen Zusammensetzung, besonders in der Difurano-Cumarin-Struktur und im Vorhandensein eines Lactonringes die Ursache für die leichte Veränderlichkeit der Aflatoxine durch äußere Einflüsse. Neben Änderungen in ihrem chromatographischen oder absorptionsspektrographischen Verhalten können dadurch anscheinend vor allem auch Modifikationen in den Fluoreszenzen auftreten.

Bei Zusatz von Säuren oder Laugen, z.B. in Form von verdünnten HCl-, H_2SO_4 -, NaOH-, KOH-, NaCl- Lösungen, treten beim Aflatoxin B_1 mehrere neue Abkömmlinge des Toxins auf, die jedoch BÖSENBERG (1970 b) nicht näher charakterisierte.

In leicht saurem Milieu wird Aflatoxin B_1 nach POHLAND et al. (1968) zu dem Aflatoxin B_1 -Hemiacetat umgebaut.



Aflatoxin B_1 -Hemiacetat

Dünnschichtchromatographisch ist es dann als ein fluoreszierender Punkt mit dem niedrigen Rf-Wert von 0.08 bei Verwendung von Methanol-Chloroform (7:93) als Fließmittel nachweisbar. Seine Absorptionsbänder liegen im IR-Spektrum bei 3436, 1751, 1675, 1623, 1590, 1543, 1481, 1366, 1211, 1092, 1135 und 1067 cm^{-1} , die Absorptionsmaxima im UV-Spektrum bei 354 und 262 nm in Chloroform, bei 362 nm in Methanol.

Die biologische Aktivität des Hemiacetates des Aflatoxin B_1 ist sehr gering. Eine die Entwicklung des Hühnerembryos nachteilig be-

einflussende Wirkung des Aflatoxin B_1 80fach und die des Zellkulturwachstums 50fach übersteigende Menge dieser Verbindung hat sich gegenüber diesen Testobjekten noch als atoxisch erwiesen (POHLAND et al., 1968).

Ein interessantes Phänomen wurde innerhalb zweier heißer Sommermonate beobachtet:

Aspergillus flavus-Stämme, die sich als gute Aflatoxinbildner auszeichneten, ergaben bei der dünnschichtchromatographischen Aufarbeitung eine Aflatoxin B_1 entsprechende Fluoreszenz, wiesen aber bei der "Gegenprobe" in der Spektralanalyse ein völlig anderes UV-Absorptionsspektrogramm auf (BÖSENBERG, 1970 b). Somit können sogar Witterungsverhältnisse das Testergebnis beeinflussen.

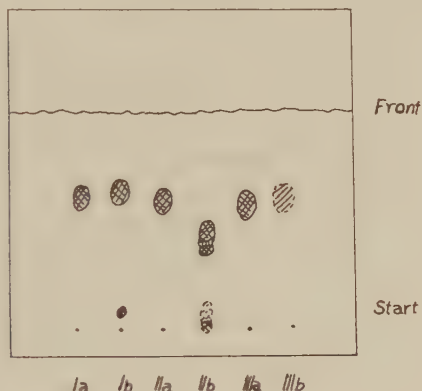
Die Einwirkung von UV-Licht hat eine schnelle Veränderung der Aflatoxine zur Folge. In physiologischer Kochsalzlösung aufgenommenes Aflatoxin B_1 , welches UV-Strahlen ausgesetzt war, trennt sich im Chromatogramm bei Verwendung des Fließmittels Chloroform-Methanol (97:3) in zwei Fluoreszenzflecke auf, wobei der eine Fleck mit einem niedrigeren R_f -Wert als Aflatoxin B_1 anzeigt, während der zweite in Höhe des Aflatoxin B_1 erscheint. Äthanol-Eluate der Verbindung mit niedrigerem R_f -Wert als Aflatoxin B_1 unterscheiden sich im UV-Absorptionsspektrogramm vom unveränderten Toxin. Es sind dabei nicht nur die Extinktionshöhen bei den Absorptionsmaxima verschoben, sondern es tritt zudem ein Maximum bei 310 nm auf.

Neue Fraktionen, die sich dünnschichtchromatographisch wie Aflatoxin B_1 verhalten, aber wiederum unterschiedliche UV-Absorptionskurven liefern, entstehen nach erneuter Überprüfung der bestrahlten Substanz in physiologischer Kochsalzlösung, sowie nach Rücküberführung in Chloroform (BÖSENBERG, 1969).

Bei Bestrahlung der Aflatoxine nach Aufnahme in Chloroform mit UV-Licht nimmt die Intensität der Fluoreszenz im Chromatogramm ab, wobei der R_f -Wert identisch ist mit dem unbehandelten Toxin. Werden wässrige oder methanolhaltige Aflatoxinlösungen dem UV-Licht ausgesetzt und anschließend dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, treten neue fluoreszierende Derivate mit niedri-

gerem Rf-Wert auf.

Abb. 3: Chromatogramm von unbestrahltem Aflatoxin B₁ in wäBriger-(I), Methanol-(II) und Chloroform-(III) Lösung vor (a) und nach (b) 45 minütiger Bestrahlung mit UV-Licht (20 cm Abstand von einer HANAU-Quecksilberdampfampe) nach BÜSENBERG (1970 b)



Aus der Abb. 3 ist zu ersehen, daß die Fluoreszenz des Abkömmlings des bestrahlten Aflatoxin B₁ in methanolischer Lösung einen Rf-Wert aufweist, welcher denjenigen des unbestrahlten Toxins sehr ähnlich ist. Die UV-Absorptionskurve dieser Verbindung hat jedoch eine minimale Absorption bei 362 nm (im Gegensatz zu Aflatoxin B₁) und ein deutliches Maximum bei 265 nm, wodurch sie sich vom Aflatoxin B₁ unterscheidet.

ANDRELLIOS et al. (1967) beschreiben ebenfalls chemische Veränderungen des Aflatoxin B₁ durch Lichteinflüsse. Sie beobachteten nach Einwirkung von UV-Licht mit der Wellenlänge von 365 nm das Auftreten eines neuen fluoreszierenden "Photoproduktes". Diese Fluoreszenz wies wiederum einen wesentlich niedrigeren Rf-Wert als das nicht vorbehandelte Toxin auf. Es zeigte sich, daß das UV-Strahlen ausgesetzte Aflatoxin B₁ in Konzentrationen, in denen unbestrahltes Aflatoxin B₁ akut toxisch wirkt, keinen gleichwertigen Effekt auszulösen vermag. Die Unter-

suchungen wurden an Mäuserembryonen und Veffelkornen durchgeföhrt.

2.2.2 Mikrobielle Stoffwechselvorgänge

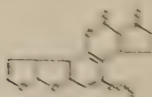
Die Feststellung, daß das Wachstum von *Trichothema reesei* durch aflatoxinhaltige Extrakte gehöhert wird, wird zur Frage auf, ob dieser Mikroorganismus Aflatoxine abbauen vermag, bei in diese Richtung zielenden Versuchen stöhlt GILNINSON und WOSWITSON (1967) im Chromatogramm des Verhauenssaftes einer bislang noch unbekannten, stark blauen Pilzessenz fest.

Als R_F-Wert der rein extrahierten Verbindung gehen die Autoren 0,52 an. im Vergleich zu den R_F-Werten von Aflatoxin B₁ 0,58 und von Aflatoxin B₂ 0,55 zeichnet sich dieser Stoff wiederum durch einen niedrigeren R_F-Wert als Aflatoxin B₁ aus.

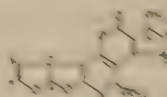
In der Intensität der Fluoreszenz besteht ein Unterschied zwischen Aflatoxin B₁ und den Proben des *T. reesei*-Stoffwechsels. Sie ist bei letzteren nur halb so stark ausgeprägt. Die Verbindung tritt in Erscheinung auf Kieselgel beschichteten Platten, wenn diese in einem Gemisch von Methylform-Keton- β -Propanol (825:150:25) entwickelt werden. Außerdem ist für die Verbindung ein UV-Absorptionsspektrogramm mit Maxima bei 250, 261 und 328 nm (in Methanol) charakteristisch.

Sie wird heute in der Literatur als Aflatoxin B₃ geföhrt.

ROBERTSON et al. (1970) gelang es noch weitere Eigenschaften dieses Aflatoxin B₃-Derivates zu ermitteln. Es weist ein Molekulargewicht von 314 und eine IR-Absorption bei 3400, 1700, 1600 und 1505 cm⁻¹ auf. Das nukleomagnetische Resonanzspektrum ähnelt weitgehend dem des Aflatoxin B₁. Die Autoren nehmen an, daß das Protozoon *T. papillans* das Gerüst im Verlegetensstadium (C=O) des Aflatoxin B₁ zu einem ungesättigten (C=C) reduziert, was aus die unten stehende Verbindung resultiert.



Aflatoxin B₁



Aflatoxin B₃

Inzwischen ist bekannt, daß auch verschiedene Pilze, wie *Dactylium dendroides*, *Mucor griseo-cyanus*, *Helminthosporium sativum* und *Absidia repens* Aflatoxin B_1 in Aflatoxin R_0 überführen können (DETROY und HESSELLINE, 1968 und 1969).

Der Einsatz dieser Schimmelpilze zur mikrobiellen Detoxifikation der Aflatoxine hatte die Entdeckung einer weiteren fluoreszierenden Variante zur Folge, die als R_1 bezeichnet wird. Sie tritt auf nach längerer Bebrütung von mit Aflatoxin B_1 beschickten Pilzkulturen.

Aflatoxin R_0 und R_1 werden von den Autoren folgendermaßen charakterisiert:

Die R_f -Werte liegen nach dünn-schichtchromatischer Auftrennung in Aceton-Chloroform (20:80) bei 0,57 respektive 0.50; (er beträgt bei gleichartiger Entwicklung 0.69 für Aflatoxin B_1); die Maxima der UV-Absorption werden für R_0 bei 254, 261 und 325 nm angegeben; die Absorptionspeaks des IR-Spektrums zeigen Änderungen bei 1750 und 1685 cm^{-1} , sowie ein breites Band bei 3400 cm^{-1} im Vergleich zu Aflatoxin B_1 . Für R_1 liegen diesbezüglich noch keine Werte vor.

Die biologische Aktivität des Aflatoxin R_0 wurde im Ententest an Hand des Auftretens von Hyperplasie der Gallengänge gemessen.

Aflatoxin R_0 erwies sich dabei 18mal schwächer toxisch als Aflatoxin B_1 .

Bei der Überprüfung einer großen Zahl von Hefen, Schimmelpilzen, Bakterien, Strahlenpilzen und Algen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Aflatoxin B_1 zu entgiften, war es CIEGLER et al. (1966) möglich, eine Transformation des Aflatoxin B_1 in andere fluoreszierende Verbindungen festzustellen:

Aspergillus niger-Kulturen, deren Nährmedien Aflatoxin B_1 zugesetzt war, zeigten nach elftägiger Inkubation und anschließender dünn-schichtchromatographischer Aufarbeitung (nach DE JONGH et al., 1962) eine intensive blaue Fluoreszenz mit einem R_f -Wert von 0.25; ein für Aflatoxin B_1 charakteristischer Fluoreszenzfleck trat nicht in Erscheinung.

Penicillium raistrickii, Stamm NRRL 2038 wandelte Aflatoxin B_1 teilweise zu einer neuen Verbindung um, deren R_f -Wert dem des

Aflatoxin B₂ ähnelte.

In Gegenwart der Sporen der Schimmelpilze *A. terreus*, Stamm NRRL 1967, *A. flavus*, Stamm NRRL 3000 und *A. luchuensis*, Stamm NRRL 2053 waren dagegen blaß-blau fluoreszierende Derivate nachweisbar, die in Höhe der folgenden R_{Aflatoxin B₉}-Werte 0.87, 0.80, 0.30, 0.20, 0.08, 0.03 anzutreffen waren. Nur die Flecke bei 0.87, 0.80 und 0.08 fluoreszierten stark, die restlichen schwach. Diese Verbindungen werden aber von CIEGLER et al., (1966) weder als Produkte eines autokatalytischen Abbauvorganges, noch als Zellinhaltsstoffe der Schimmelpilzsporen gewertet. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung dieser Frage erforderlich.

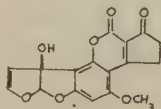
2.2.3 Metabole Prozesse des Tierkörpers

Mit aflatoxinhaltigem Erdnußmehl gefütterte Kühe scheiden mit der Milch eine Aflatoxin B₁-ähnliche toxische Verbindung aus, die bei Entenküken gleichartige Leberveränderungen wie das Aflatoxin B₁ verursacht. Es trägt den Namen Aflatoxin M (ALLCROFT und CARNAGHAN, 1963; ALLCROFT et al., 1966).

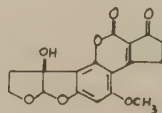
Auch in der Milch laktierender Ratten, denen oral Aflatoxin B₁ verabreicht wurde, läßt sich dieses sog. "Milchtoxin" nachweisen (DE JONGH et al., 1964 b). Da es jedoch auch aus Rattenlebern (BUTTLER und CLIFFORD, 1965) gewonnen werden konnte, wird angenommen, daß Aflatoxin B₁ in diesem Organ zumindest teilweise umgebaut wird. Organextrakte (Leber, Niere), sowie Harn, von zwei Stunden nach Aflatoxinverabreichung getöteten Schafen enthielten bei Untersuchungen von ALLCROFT et al. (1966) das gleiche Toxin.

Versuche, ob und in welcher Menge dieser Metabolit in Trockenmilchprodukten wiederzufinden ist, liegen von NEUMANN-KLEINPAUL und TERPLAN (1972) vor.

Bei Aflatoxin M lassen sich zwei Komponenten M₁ und M₂ unterscheiden; sie stellen nach heutigen Kenntnissen hierüber Monohydroxy-Derivate des Aflatoxin B₁ und B₂ dar (HOLZAPFEL et al., 1966).



Aflatoxin M₁



Aflatoxin M₂

Nur bei Anwendung der Papierchromatographie läßt sich das Milcht toxin in seine beiden Komponenten auftrennen (M_1 : Rf-Wert 0.34, blauviolette Fluoreszenz; M_2 : Rf-Wert 0.23, blaue Fluoreszenz) (HOLZAPFEL et al., 1966b). Im Dünnschichtchromatogramm tritt es lediglich als ein blauvioletter Fluoreszenzfleck in Erscheinung mit einem Rf-Wert weit unterhalb dem des Aflatoxin B_1 , wenn es, auf eine Kieselgel G-DC-Platte aufgetropft, in Chloroform-Methanol (97:3) entwickelt wurde; M_1 hat den Rf-Wert von 0.40, B_1 einen Rf-Wert von 0.56 (SCHOENTAL, 1967); respektive M_1 einen Rf-Wert von 0.25, B_1 einen von 0.50 (ROBERTS und ALLCROFT, 1968). Im IR-Spektrum unterscheidet sich Aflatoxin M_1 von Aflatoxin M_2 durch einen Absorptionsspek bei 3425 cm^{-1} (= Hydroxyl-Gruppe).

In der LD_{50} des Aflatoxin M_1 und M_2 für Entenküken (bezogen auf 40-50 g Körpergewicht) besteht ein weiterer Unterschied zwischen beiden Komponenten. Sie beträgt bei ersterer 16 μg , bei letzterer dagegen 61,4 μg ; bei Aflatoxin B_1 liegt die LD_{50} bei 12 $\mu\text{g}/\text{Tier}$.

Da die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Aflatoxin M mit herkömmlichen Mitteln nicht befriedigte, suchten STACK et al. (1972) nach Möglichkeiten auf anderer Art und Weise zu einem Nachweis von Aflatoxin M_1 und M_2 zu gelangen. Auf dem Weg über die Anwendung verschiedener chemischer Reaktionen entdeckten sie zwei Derivate, das Acetat und das korrespondierende Hemiacetat des Aflatoxin M_1 , die sich im Dünnschichtchromatogramm bei Verwendung von Aceton-Chloroform (1:9) als Fließmittel mit folgenden Rf-Werten neben Aflatoxin M_1 (0.11) in Erscheinung treten: Acetat-Derivat 0.54, Hemiacetat 0.08.

Weitere Metaboliten des Aflatoxinstoffwechsels, die im Chromatogramm mit Aflatoxin B_1 verwechselt werden können, wies BÖSENBERG (1969) in Organ- und Ausscheidungsextrakten von weiblichen Ratten nach, denen er Aflatoxin B_1 (oder Aflatoxin G_1) intravenös injiziert hatte. Nur mit Hilfe des UV-Absorptionsspektrogramms war eine Differenzierung möglich: das Maximum bei 362 nm fehlte, die Maxima bei 250 bis 260 nm entsprachen dem Ursprungstoxin. Aflatoxin M konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

Der Rattenorganismus scheint dafür prädestiniert zu sein, Aflatoxin B_1 in verschiedene Metaboliten umzubauen. Das bestätigen

auch die Untersuchungen von BASSIR und OSIYEMI (1967).

Aflatoxin P_1 , eine Phenolverbindung der O-Demethylierung des Aflatoxin B_1 , wurde neben Aflatoxin M_1 im Urin von Rhesusaffen vorgefunden, an die intraperitoneal Aflatoxin B_1 appliziert worden war (DALEZIOS et al., 1971). Diese Verbindung fluoresziert im UV-Licht gelbgrün mit einem von Aflatoxin B_1 und M_1 , sowie dem Hemiacetat-Derivat des Aflatoxin B_1 abweichenden Rf-Wert und dürfte somit von anderen Metaboliten des Aflatoxinstoffwechsels im Tierkörper leicht zu unterscheiden sein.

2.2.4 Andere Aflatoxine

LIJINSKY und BUTLER (1966) versuchten eine Mischung von Aflatoxinen, die von einem auf Erdnüssen gewachsenen *Aspergillus parasiticus*-Stamm gewonnen worden war, dünnschichtchromatographisch aufzutrennen und machten dabei folgende Beobachtungen:

Auf einer 5x20 cm großen, 0,5 mm dick mit Kieselgel G beschichteten DC-Platte zeigte sich Aflatoxin G_1 nach Entwicklung mit dem Fließmittel Chloroform-Diäthyläther-Ameisensäure (2:2:1) an manchen Stellen mit grüner, an anderen mit blauer Fluoreszenz an. Die grün fluoreszierende Zone entsprach einer Zone von gelber Farbe bei sichtbarem Licht. Daraus folgerten die Autoren, daß Aflatoxin G_1 nicht, wie zuvor behauptet wurde, eine grün fluoreszierende Verbindung ist, sondern, daß diese Farbe auf eine gelbe Verunreinigung zurückzuführen ist.

Durch Elution gelang es, Aflatoxin G_1 soweit zu reinigen, daß nur noch die blaue Fluoreszenz im Chromatogramm sichtbar wurde. Seither hat das frühere Unterscheidungsmerkmal von Aflatoxin B_1 und Aflatoxin G_1 an Hand der unterschiedlichen Farbe der Fluoreszenz keine Gültigkeit mehr, zumal mittlerweile bekannt ist, daß Aflatoxin B_1 in Gegenwart gelber Verunreinigungen auch grün fluoreszieren kann.

Die Überprüfung der Toxizität der einzelnen Aflatoxin G_1 -Fraktionen wurde an Entenküken vorgenommen, wobei sich in Abhängigkeit von der Farbe der Fluoreszenz unterschiedliche Werte ergaben. Die LD_{50} des grünen Aflatoxin G_1 lag bei 54,08 μ g (44,25-66,36 μ g) $\hat{=}$ 0,95 mg/kg KGW, beim blauen Aflatoxin G_1 dagegen bei 45,7 μ g (28,3-78,0 μ g) $\hat{=}$ 0,785 mg/kg KGW. Mit Aflatoxin B_1 wurde als LD_{50} -

Wert 17,5 μg (14,3-21,57 μg) = 0,335 mg/kg KGW ermittelt.

Die nach Aflatoxin G_1 -Verabreichung nachweisbaren Leberlaesionen wiesen unabhängig von der Farbe der Fluoreszenz des Toxins keine Unterschiede auf.

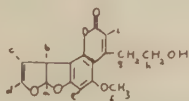
KWON und AYRES (1967) bestätigten nach erneuter Reinigung von Aflatoxin G_1 -Extrakten die blaue Farbe der Fluoreszenz als zutreffend für dieses Mykotoxin.

Aflatoxin M wird nicht nur als Metabolit des Aflatoxin B_1 im Warmblüterorganismus gebildet, sondern es kann als solches auch bereits innerhalb der B_1 -Fraktion vorliegen.

Der Nachweis dieses Toxins in verpilzten Erdnüssen (KEPPLER und DE JONGH, 1964; DE JONGH et al., 1964 b; HOLZAPFEL et al., 1966 b) und in verschimmeltem Reis (MASRI et al., 1967) legte zunächst die Vermutung nahe, daß es auch im Schimmelpilzstoffwechsel anfällt. PURCHASE et al. (1968) gelang es durch gezielte Untersuchungen an Stämmen der *Aspergillus flavus-oryzae*-Gruppe und STUBBLEFIELD et al. (1970 a) durch Extraktion von mit *A. flavus* fermentierten Reis diese Annahme zu bestätigen.

Bei Extraktionen einer *A. flavus*-Kultur wiesen HEATHCOTE und DUTTON (1969) im Dünnschichtchromatogramm neben einer Reihe bereits bekannter, teilweise chemisch charakterisierter Fluoreszenzen eine neue blau fluoreszierende Verbindung nach, welche als Derivat der Aflatoxine erkannt wurde und die Bezeichnung Aflatoxin B_3 erhielt.

Der Rf-Wert dieses Metaboliten wird mit 0.28 angegeben und liegt zwischen Aflatoxin M_1 und G_2 . Die UV-Absorptionsmaxima (in Methanol) betragen 229, 253, 262 und 326 nm, das IR-Spektrum zeigt Werte von 3400, 3040, 2900, 1725, 1622 und 1070 cm^{-1} an.



Aflatoxin B_3

Aflatoxin B_3 geht vermutlich aus Aflatoxin G_1 hervor. Diese Annahme leitet sich einmal von der Struktur der Verbindung ab, und zum anderen von der Beobachtung, daß bei Extraktionen immer dann kein Aflatoxin B_3 gefunden wurde, wenn reines Aflatoxin B_1 und G_1 nebeneinander vorlagen. Die Richtigkeit dieser Vermutung fand eine Bestätigung durch die Arbeit von COLE und KIRKSEY (1971). Die Autoren wiesen nach, daß *Rhizopus stolonifera*, *R. arrhizus*, *R. oryzae* und andere *Rhizopus* spp. Aflatoxin G_1 abbauen. Als ein Produkt dieses Abbauvorganges wurde eine Verbindung festgestellt, die als Aflatoxin B_3 identifiziert werden konnte.

RODRICKS et al. (1968 b) beschrieben als erste ein neues Toxin mit dem Namen Aspertoxin, das aus *Aspergillus flavus*-Kulturen isoliert wurde. Eine ursprüngliche Verwechslung mit Aflatoxin M_1 beruht auf demselben Rf-Wert (0.32) bei Verwendung von Kieselgel DC-Platten und Chloroform-Aceton (9:1) als Laufmittel. Eine Unterscheidung ist aber mit den Fließmitteln Chloroform-Pyridin (9:1) oder Chloroform-Essigsäure (9:1) möglich; der Rf-Wert des Aspertoxin beträgt dann 0.55-0.60; der des Aflatoxin M_1 0.40.

Das UV-Spektrum (in Methanol) des Aspertoxin zeigt Maxima bei 310 und 341 nm, das IR-Spektrum hat Absorptionbanden bei 3354, 1656, 1630, 1587, 1575, 1460, 1269, 1133 und 1103 cm^{-1} .

Die Toxizität wurde im Hühnerembryotest geprüft. 2,0 $\mu\text{g}/\text{Ei}$, entweder in den Dottersack oder in die Luftkammer befruchteter Eier injiziert, töteten 100 % der Embryonen ab. Als LD_{50} wurde bei Luftkammerbeimpfung 0,7 $\mu\text{g}/\text{Ei}$ ermittelt. Es weist danach eine geringere Toxizität als Aflatoxin B_1 auf (LD_{50} 0,025 $\mu\text{g}/\text{Ei}$). Schnabelmißbildungen, generalisierte Ödeme, Verlust des Muskeltonus und Haemorrhagien, durch die Nabelgefäße verursacht, konnten makroskopisch an nicht lebensfähigen Embryonen diagnostiziert werden. Im Gegensatz zum Aflatoxin B_1 erfolgte das Absterben der Embryonen zu einem späteren Zeitpunkt der Bebrütung.

Ein weiteres blau fluorszierendes Aflatoxinderivat, das Aflatoxin B_{2a} , sei nur der Vollständigkeit halber erwähnt, denn von dieser Verbindung im Dünnschichtchromatogramm auftretender Werte differieren zu stark von denen des Aflatoxin B_1 , um Anlaß zu Verwechslungen zu geben (DUTTON und HEATHCOTE, 1966 und 1968).

Aflatoxin B_{2a} stellt ebenfalls ein Hydroxy-Aflatoxin dar, das bislang nur in *A. flavus*-Kulturen auf Kartoffel-Dextrose-Agar zum Nachweis gelangte und eine wesentlich geringere Toxizität für Entenküken besitzt als das Aflatoxin B_1 .

2.2.5 Aflatoxin B_1 -vortäuschende Metaboliten von Schimmelpilzen

Extrakte aus mit *Macrophomina phaseoli* verpilzten Erdnüssen zeigen, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, eine blaue Fluoreszenz, deren Rf-Wert mit dem des Aflatoxin B_2 identisch ist (SCHROEDER, 1968), das aber auch als Aflatoxin B_1 angesprochen werden kann. Da Erdnüsse verhältnismäßig oft von diesem Schimmelpilz befallen sind, muß an das mögliche Auftreten dieses blau fluoreszierenden Metaboliten gedacht werden.

Mit folgenden Fließmittelsystemen kann diese Verbindung gut von den B-Aflatoxinen abgetrennt werden, nämlich mit Chloroform-Aceton-Äthyläther (5:1:4), Benzol-Aceton-Essigsäure (80:9:10) oder Benzol-Essigsäure (90:10).

CROWTHER (1968) beschäftigte ebenfalls die Interferenz dieses Stoffes mit anderen Schimmelpilzmetaboliten. Er stellte fest, daß neben Erdnüssen auch Mais, Mehl aus Sonnenblumenkernen, Kakao und Kassawa mit *M. phaseoli* infiziert sein können. Da nach seinen Untersuchungen *M. phaseoli* neben einer blau fluoreszierenden auch eine grün fluoreszierende Verbindung bildet, kann das Auftreten der letzteren zur Identifizierung herangezogen werden. Sind in einer Probe neben blau fluoreszierenden Flecken in Höhe von Aflatoxin B_1 - B_2 grün aufluchtende Substanzen bei einem Rf-Wert zwischen 0.6-0.75 wahrnehmbar, dann empfiehlt es sich, die DC-Platte in Diäthyläther nochmals zu entwickeln. Verschieben sich die Rf-Werte der blauen und grünen Flecke in eine Höhe von 0.9 und 1.0, dann handelt es sich nicht um Aflatoxin B_1 - B_2 , da sich Rf-Werte dieser Toxine hierbei konstant verhalten.

Parasiticol stellt vornehmlich ein Stoffwechselprodukt des *Aspergillus parasiticus* dar. In kleinen Mengen wird es auch von *A. flavus* gebildet. Es stellt sich nach dünnschichtchromatographischer Aufarbeitung mit einer starken blauen Fluoreszenz im Bereich der

Aflatoxine dar (STUBBLEFIELD et al., 1970 b). Von den Autoren STUBBLEFIELD et al. (1970 b) wird eine Identität des Parasiticol mit dem von HEATHCOTE und DUTTON (1969) beschriebenen Aflatoxin B_3 als gesichert angesehen. Deshalb sollen in diesem Zusammenhang die biologischen Eigenschaften dieser Verbindung nur noch ergänzt werden.

Im Entenkükentest zeigte Aflatoxin B_3 die gleiche akute Toxizität wie Aflatoxin B_1 . Im Gegensatz zu Aflatoxin B_1 sind aber unter Aflatoxin B_3 nur leichte Hyperplasie der Gallengänge unabhängig von der Höhe der Dosis nachweisbar. Im Hühnerembryotest erwies sich Parasiticol 100-200fach schwächer toxisch als Aflatoxin B_1 . Die LD_{50} lag hier bei 5-10 $\mu\text{g}/\text{Ei}$.

Nach STUBBLEFIELD et al. (1970 b) tritt das Aflatoxin B_3 respektive Parasiticol nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung in Aceton-Chloroform-Wasser (12:88:1,5) ungefähr in der Mitte zwischen den anderen Verbindungen der aflatoxinproduzierenden Pilze auf. Die Anordnung geht aus der nachfolgenden Abbildung (s. Abb. 4) hervor.

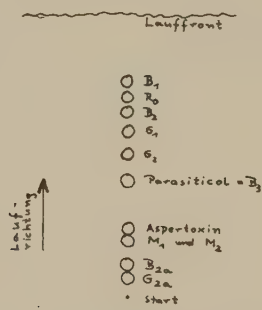


Abb. 4 : Darstellung der von Schimmelpilzen gebildeten Aflatoxine im Chromatogramm nach STUBBLEFIELD et al. (1970 b)

SINGH (1970) wies in *Aspergillus parasiticus*-Extrakten weitere fluoreszierende Substanzen nach, die sich im Fließmittelsystem Toluol-Isoamylalkohol-Methanol (90:32:3) ober- und unterhalb der Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 , G_2 auftrennen. Diese Verbindungen sind jedoch nicht näher charakterisiert worden, so daß lediglich vermutet werden kann, daß es sich bei einer dieser fluoreszierenden Stoffe um Parasiticol handelte.

Um die Frage abzuklären, welche der in der Literatur als Aflatoxinproduzenten beschriebenen Species tatsächlich zur Bildung von Aflatoxinen befähigt ist, untersuchten WILSON et al. (1968) 29 unterschiedliche Arten, hauptsächlich der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium*. Dabei erhielten sie in Kulturextrakten einige nicht identifizierbare, im Dünnschichtchromatogramm blau oder grün fluoreszierende Substanzen. Durch die Anwendung verschiedener Arbeitsvorgänge konnten diese jedoch von den Aflatoxinen abgetrennt werden. Es empfiehlt sich hierzu wiederum eine Vorentwicklung der DC-Platte in Diäthyläther. Aflatoxinvertäuschende Substanzen wandern bis Höhe der Lauffront, die Aflatoxine ordnen sich dagegen in niedrigeren Rf-Bereichen an.

Ein ähnliches Ziel wie WILSON et al. (1968) verfolgten MISLIVEC et al. (1968) bei ihren Untersuchungen. Sie prüften zu diesem Zweck 43 *Penicillium* spp. und sieben Arten der Gattung *Aspergillus* auf ihre Fähigkeit, Aflatoxine zu bilden. Als Anreicherungssubstanz wählten sie polierten Reis. Im allgemeinen reichte ein Laufmittelsystem aus, um den daraus gewonnenen Pilzkulturextrakt zu analysieren. Kulturextrakte der Species *A. terreus*, *P. cyclopium*, *P. funiculosus*, *P. oxalicum*, *P. patulum* und *P. urticae* bereiteten jedoch Schwierigkeiten bei der Auswertung, da unbekannte Verbindungen nicht eindeutig von den Aflatoxinen in Bezug auf Rf-Wert und Fluoreszenzfarbe zu trennen waren.

Die Anwendung der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie oder das Aussetzen der Fluoreszenzflecke von Joddampf erwiesen sich als erfolgreich. Im Gegensatz zu den nachweisstörenden Substanzen verlieren Aflatoxine durch Einwirkung des Joddampfes ihre fluoreszierenden Eigenschaften.

Seit Jahrhunderten werden in Japan zur Herstellung von Skoyu, Miso, Sake etc. Schimmelpilze der *Aspergillus flavus-oryzae*-Gruppe als Enzymquelle verwendet. YOKOTSUKA et al. (1967 a) bemühten sich, durch intensive Nachforschungen festzustellen, ob diese Fermentbildner eventuell auch zur Toxinproduktion befähigt sind. Dabei wurde in Kulturextrakten im Dünnschichtchromatogramm Aflatoxin B-ähnliche Verbindungen nachgewiesen. Fünf blau fluoreszierende Flecke bezeichneten die Autoren in der Reihenfolge der

ansteigenden Rf-Werte als B 0, B 1, B 2, B 3 und B 4. Durch Änderung in der Zusammensetzung des Kulturmediums wurden weitere Verbindungen, B 5, B 6 und B 7, im Dünnschichtchromatogramm sichtbar.

Mit Hilfe verschiedener Fließmittel und des UV-Absorptions-spektrogramms erwiesen sich diese Verbindungen letztlich nicht als B-Aflatoxine. Nach der Anzeige im IR-Spektrum entspricht B 0 einer Butylpyrazin-Verbindung, B 2 Flavocol, B 4 Deoxyhydroxy-Aspergillinsäure und B 6 Deoxyhydroxymeta-Aspergillinsäure. B 3, B 5 und B 7 unterscheiden sich von anderen Verbindungen durch die IR-Absorption bei 3400 cm^{-1} .

In mehreren Arbeiten liegen mittlerweile von YOKOTSUKA et al. (1967 b und 1968) und SASAKI et al. (1967 und 1968 a, b) ausführliche Beschreibungen der, insbesondere von *A. sojae* gebildeten Verbindungen, in Bezug auf dünn-schichtchromatographisches Verhalten, chemische Zugehörigkeit und biologische Aktivität vor.

Ein blauviolett fluoreszierendes Produkt von *A. oryzae* T-17, das Asperopterin, B wurde von KANEKO und SANADA (1969) isoliert, jedoch ohne es mit den Eigenschaften der Aflatoxine zu vergleichen.

Mit der Problematik der Toxizität von Stoffwechselprodukten, die in mit Schimmelpilzen fermentierten Nahrungsmitteln auftreten, beschäftigen sich weitere japanische Forschergruppen, u.a. KINOSITA et al. (1968) und MURAKAMI et al. (1967 und 1968 a, b). Dabei wird abermals deutlich, welche Schwierigkeiten sich ergeben können bei der Vielfalt der sich chromatographisch darstellender Stoffe.

Mycotoxine wie Ochratoxin B und Zearalenone, die im Dünnschichtchromatogramm ebenfalls blau fluoreszieren, können auf Grund ihrer sehr abweichenden Rf-Werte wesentlich einfacher identifiziert werden. Im Zweifelsfalle schaffen Sprühreagenzien, z.B. Schwefelsäure oder Eisenchlorid, Klarheit (STEYN, 1969; SCOTT et al., 1970), worauf bereits unter 2.1 hingewiesen wurde.

2.2.6 Aflatoxin B_1 -vortäuschende Verbindungen anderer Herkunft

Im Laufe der letzten Jahre wurden die verschiedenartigsten Futter- und Lebensmittel, sowie auch deren Rohstoffe vornehmlich auf das Vorkommen von Aflatoxinen untersucht. Es stellte sich dabei heraus, daß beim dünnschichtchromatographischen Nachweis Schwierigkeiten auftreten können, die hauptsächlich auf in Pflanzen anzutreffende aflatoxinvortäuschende Fluoreszenzen zurückzuführen sind.

2.2.6.1 Vorkommen in Auszügen von Futtermittelrohstoffen und Mischfutter

Der Aflatoxin B_1 -Nachweis kann nach bisherigen Kenntnissen hierüber erschwert sein, wenn Alfalfa*, Tapioka, Hafer, Mais, Weizen, Erdnüsse, Baumwollsaat oder Malzkeime in einem Produkt enthalten sind.

WILEY (1966) empfiehlt deshalb ein von üblichen Fließmitteln abweichendes System zur Analyse, mit welchem sich interferierende Fluoreszenzen von Agrarprodukten abtrennen lassen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß sich Nebenfluoreszenzen besonders störend bei der quantitativen Auswertung auswirken können. In einem relativ reinen Untersuchungsmaterial wie Weizen ist es möglich, Aflatoxine noch bis zu einer Konzentration von 10 ppb zu bestimmen, während bei Alfalfa, da es sehr viele interferierende Fluoreszenzen enthält, ein Nachweis nur bis 40 ppb Aflatoxin B_1 gelingt. Als zur Entwicklung der DC-Platten geeignet, gibt die Autorin Methylacetat anstelle des üblichen Methanol-Chloroform-Fließmittelsystems an.

Von Tapioka ist bekannt, daß trotz säulenchromatographischer Vorreinigung der Extrakte im Dünnschichtchromatogramm eine leuchtend blaue Fluoreszenz in Erscheinung tritt. Der R_f -Wert dieser Verbindung liegt zwar unter dem des Aflatoxin B_1 , da aber durch andere im Extrakt vorhandene Begleitsubstanzen oder durch äußere Einflüsse (s. S. 24) Flecke im Aflatoxin B_1 -Bereich auftreten können, müssen zusätzliche Nachweisreaktionen zur Absicherung

des Testergebnisses herangezogen werden (DIETRICH und KUMMER, 1971).

Hafer stellt ebenfalls ein Agrarprodukt dar, das Schwierigkeiten bei der Mykotoxinanalyse bereiten kann (SHOTWELL et al., 1968 und 1969 b). Die Untersuchung zahlreicher mykologisch einwandfreier Haferproben ergab, daß diese Getreideart fluoreszierende, mit I und II bezeichnete, Verbindungen enthält, deren dünnschichtchromatographische Eigenschaften denen des Aflatoxin B_1 und G_1 entsprechen. Ergänzend dazu mit Hafergrütze durchgeführte Versuche erbrachten den Nachweis, daß die interferierenden Verbindungen in den Haferschalen vorliegen.

Als sicherste Methode der Abtrennung der Verbindung I und II von den Aflatoxinen wird angegeben die Verwendung von mit Kieselgel G-HR beschichteten DC-Platten und die zweimalige Entwicklung in methanolhaltigem (5 oder 7 %) Chloroform.

Außerdem ist es möglich mit dem ANDRELLOS und REID-Test (1964), das Aflatoxin B_1 näher zu charakterisieren. Dazu werden Eluate der Extrakte aufgeteilt, mit Ameisensäure-Thionylchlorid, Essigsäure-Thionylchlorid oder Trifluoro-Essigsäure behandelt und im Vergleich zu einer reinen Standard-Aflatoxin B_1 -Lösung im UV-Licht erneut beurteilt. Die in Gegenwart von Aflatoxin B_1 in einer Probe entstehenden Derivate fluoreszieren zwar zum Teil bei von Aflatoxin B_1 abweichenden Rf-Werten, sie können aber als für Aflatoxin B_1 charakteristische Reaktionsprodukte angesehen werden. Der Test wurde von den Autoren zur Absicherung des Nachweises von Aflatoxin B_1 in Erdnußprodukten entwickelt, denn auch bei Erdnüssen kommen Aflatoxin B_1 -vortäuschende Substanzen vor, die von der Pflanze herrühren.

Die für Baumwollsaat typischen Gossypol-Pigmente, die mehrwertige, für Nutztiere giftige Phenole darstellen (KELLNER und BECKER, 1966), wirken sich verschiedentlich auch als störender Faktor bei der Aflatoxinanalyse aus. Im Dünnschichtchromatogramm überdecken sie die Fluoreszenz der Aflatoxine. Durch Zusatz von Bleiacetat bei der Extraktion können jedoch diese Pigmente ausgefällt und dadurch ausgeschaltet werden (PONS et al., 1966 a).

STOLOFF et al. (1966) modifizierten diese besonders für die Mischfutteranalyse geeignete Methode nach PONS et al. (1966 a) für den Nachweis von Aflatoxin B_1 in Baumwollsaat oder Baumwollsaatprodukten, da auch sie feststellten, daß Pigmente das Untersuchungsprodukt nicht unerheblich beeinflussen können.

Eine andere Methode zur Untersuchung von Baumwollsaat beschreiben CHEN und FRIEDMAN (1966) und erreichen damit, daß eine nicht von Schimmelpilzen herrührende blaue Fluoreszenz eliminiert wird. Das Untersuchungsmaterial wird dazu mit wässrigem Methanol extrahiert und anschließend mit Hilfe von Bleiacetat und über eine Chromatographiesäule gereinigt. Auf Kieselgel G-HR-DC-Platten aufgetropft, kann dann die Auftrennung in Chloroform-Methanol (3 %) erfolgen.

Über eine blau fluoreszierende Substanz mit einem dem Aflatoxin B_1 entsprechenden Rf-Wert berichten ASHWORTH et al. (1967). Sie kommt in Hüllen sowie Fasern der Baumwollsaat vor. Im Gegensatz zu Aflatoxin B_1 verblaßt die Verbindung im Dünnschichtchromatogramm unter Einfluß von UV-Licht sehr schnell und verschwindet bereits innerhalb einer Stunde gänzlich. Außerdem fehlen ihr die typischen UV-Absorptionsmaxima des Aflatoxin B_1 . Im ANDRELLLOS und REID-Test (1964) verhält sie sich negativ.

Von CAMPBELL und SNIDER (1969) wird die Richtigkeit der Beobachtungen von ASHWORTH et al. (1967) angezweifelt, da sie keine teilweise oder vollständige Interferenz dieser Substanzen mit dem Aflatoxin B_1 feststellten. Sie weisen auf eine abgeänderte PONS et al.-Methode (1966 a) für den Aflatoxin B_1 -Nachweis hin.

Bei naß gemahlenem Mais liefern die für den Nachweis von Aflatoxinen in diesem Agrarprodukt empfohlenen Methoden ungenügende Untersuchungsergebnisse. Extrakte mit wässrigem Methanol oder Aceton enthielten interferierende Substanzen, die weder durch Vorreinigung (z.B. über eine Kieselgel-Säule) entfernt, noch bei der Anwendung der Dünnschichtchromatographie abgetrennt werden konnten. Es wurde festgestellt, daß eine Extraktion mit Chloroform in Gegenwart von Wasser zur Verbesserung des Untersuchungsergebnisses beitragen kann (CAMPBELL, 1967).

Auch bei der Untersuchung von Weizen auf Aflatoxine durch FRIEDLANDER und GONEN (1970) traten zwei Substanzen in Erscheinung, die

sehr schwer von Aflatoxin B_1 und G_1 zu trennen waren. Da diese von den Autoren als "Pseudo-Aflatoxin" bezeichneten Stoffe auch in älteren Aflatoxin B_1 -Standards gefunden wurde, wird angenommen, daß es sich hierbei nicht um einen Inhaltsstoff des Weizens handelt, sondern um Reaktionsprodukte des Aflatoxin B_1 . Die Separierung solcher Beimengungen gelingt mit Hilfe einer Polyamid-Dünnschichtchromatographie.

KÜHNERT und BUCHHEIM (1968 a) entwickelten eine Methode speziell für die Ermittlung von Mykotoxinen in Malzkeimen, aber auch in anderen Futtermitteln wie z.B. Erdnußschrot. Damit werden jedoch neben den Aflatoxinfluoreszenzen noch weitere fluoreszierende Flecke nachweisbar. Ein Teil der blaugrün aufleuchtenden Flecke erscheinen bei einem Rf-Wert um 0.4 ähnlich den G-Aflatoxinen; ein anderer Teil zeigt mit Werten von 0.7-0.8 an. Letztere irritieren zwar beim Aflatoxin B_1 -Nachweis nicht direkt. Da sie sich aber chemisch nicht klassifizieren lassen, beeinträchtigen sie dennoch die Analyse. Es ist noch völlig offen, ob es sich hierbei um Pflanzeninhaltsstoffe oder Mykotoxine anderer chemischer Natur als die Aflatoxine handelt.

MOTZ und SCHULTZ (1968) üben an der Methode von KÜHNERT und BUCHHEIM (1968 a) Kritik. Ein sicherer Nachweis von Aflatoxin ist ihrer Ansicht nach besonders in Mischfuttermitteln nur unter Verwendung unterschiedlicher Fließmittelsysteme oder mit Hilfe der zweidimensionalen Chromatographie möglich.

Der Behauptung KÜHNERTS's und BUCHHEIM's, daß bei Rindern auftretende Malzkeimvergiftungen auf einer Aflatoxinvergiftung beruhen, stellen MOTZ und SCHULTZ als Vermutung entgegen, daß es sich hierbei ebenfalls um eine andere Toxinwirkung, hervorgerufen durch den Schimmelpilz *Aspergillus clavatus*, gehandelt haben könnte.

In einer Entgegnung zur Stellungnahme von MOTZ und SCHULTZ wird von KÜHNERT und BUCHHEIM (1968 b) erklärt, daß die fraglichen Fluoreszenzen mit Rf-Werten um 0.2 und 0.7 möglicherweise dem von MOTZ und SCHULTZ als Krankheitsursache vermuteten "Clavatus-Toxin" zuzuordnen ist; chemische Daten stehen aber noch aus.

Mit der dünnschichtchromatographischen Auftrennung von aus Mischfutter respektive deren Rohstoffkomponenten gewonnenen Extrakten

befaßten sich näher JOST und NICOLET (1969). Alle untersuchten Extrakte zeigten im Dünnschichtchromatogramm Fluoreszenzen, von denen etliche in Farbe und Rf-Wert denen der Aflatoxine ähnelten. Auch sie konnten die Frage nicht beantworten, ob es sich dabei um Schimmelpilzmetaboliten oder um Zellinhaltsstoffe von Pflanzen handelt. Die sich daraus ergebende Problematik veranschaulicht eine Abbildung, die der Arbeit von JOST und NICOLET entnommen wurde.

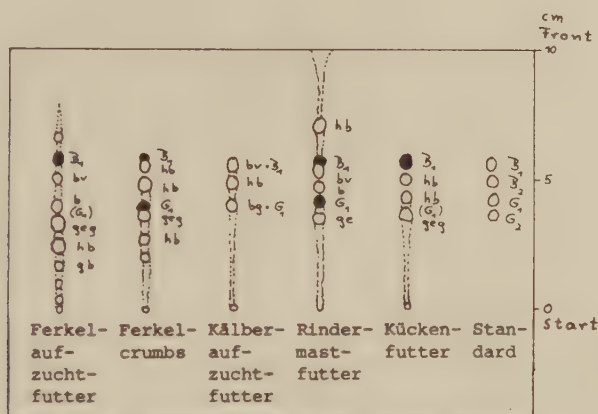


Abb. 5 : Chromatogramm der Mischfutteranalysen von JOST und NICOLET (1969): Fluoreszenzen bei 350 nm
 b = blau; hb = hellblau; bv = blauviolett; bg = blaugrün;
 g = grün; geg = gelbgrün
 Schwarze Flecken zeigen die Anordnung der zu den Extrakten
 zugefügten Standardtoxine B₁ und G₁ an.

JOST und NICOLET geben dazu folgende Erläuterung: Beim Auftreten des Standardtoxins als separater Fleck ist anzunehmen, daß der im Falle von Ferkelaufzucht- und Rindermastrfutter mit Kleinbuchstaben gekennzeichnete verdächtige Fleck kein Aflatoxin darstellt. Kommt es dagegen zu einer Überlagerung und Verstärkung eines fluoreszierenden Flecks mit dem Standardtoxin, wie im Falle der Auftrennung des Kälberaufzuchtfutters, so ist eine Probe in Bezug auf den Gehalt an Aflatoxinen als verdächtig anzusprechen. In den meisten Fällen empfinden JOST und NICOLET die Aussagekraft der Dünnschichtchromatographie auf Grund der vielen den Nachweis

störenden Verunreinigungen als unzureichend. Das wiederholte Vorreinigen über Chromatographiesäulen erweist sich oft als unerlässlich. Insgesamt gesehen, mangelt es den bisher für die Analyse zur Verfügung stehenden Nachweisreaktionen an der erforderlichen Spezifität.

2.2.6.2 Vorkommen in Extrakten von Lebens- und Genußmitteln

Blau fluoreszierende Flecke, die nicht mit Aflatoxin B_1 verwechselt werden dürfen, treten im Dünnschichtchromatogramm bei Auftrennung von Extrakten aus Aprikosenkernen, Kakaobohnen für die Herstellung von Wermut verwandten Gewürzen auf (KEPPLER und DE JONGH, 1964). Eine nähere Spezifizierung und Charakterisierung der Fluoreszenzen erfolgte jedoch nicht.

FRANK und EYRICH (1968) untersuchten unterschiedliche Lebensmittel auf ihren Aflatoxingehalt und das Vorkommen aflatoxinvortäuschender Substanzen, wobei sie voneinander abweichende Extraktionsverfahren einsetzten.

In Vollkornbrotproben erwiesen sich aflatoxinvortäuschende Verbindungen als Stoffwechselprodukte auf dem Brot gewachsener Penicillien. Extrakte aus unverschimmeltem Hartweizengries ergaben im Dünnschichtchromatogramm blau fluoreszierende Flecke, vergleichbar mit Aflatoxin B_1 . Fruchtsäfte und Weine, insbesondere Rotwein, und Zitronensirup, enthielten vielfach interferierende Substanzen.

Es zeigte sich, daß die Vorreinigung von Extrakten mit Bleiacetat auch bei der Untersuchung von Apfelsaft- und Aprikosenge-tränken sich positiv auswirkt, da sie ohne Zugabe von Bleiacetat blau fluoreszieren.

Pflaumen, Aprikosen und Mirabellen, sowie Erdbeermarmelade, eingelegte Gurken und Erbsmehlprodukte weisen fast immer blau fluoreszierende Stoffe auf, deren R_f -Werte denen des Aflatoxin B_1 sehr ähnlich sind. Das gleiche wurde bei früheren Beobachtungen an Feigen festgestellt.

Durch die Anwendung von bis zu acht verschiedenen Fließmittelsystemen und einigen Sprühreagenzien kann die Beurteilung des Analyseergebnisses erheblich erleichtert werden. Es gelingt auf diese Weise eine gute Abtrennung von störenden Cumarinen höherer

Pflanzen mit Äthylacetat, wenn es mit 10 % Ammoniak gesättigt ist. Detaillierte Angaben zur Ausschaltung interferierender Substanzen sind einer neueren Arbeit von FRANK (1969b) zu entnehmen.

Die rotbraunen Häutchen der Erdnüsse weisen eine Aflatoxin B_1 interferierende Substanz auf, die STREZLECK und KOGAN (1966) isolierten. Im Test von ANDRELLOS und REID (1964) (vgl. S. 38), sowie bei der Toxizitätsprüfung mit Entenküken als Testobjekt, verhielt sich der Stoff negativ. Zur Abtrennung dieser fraglichen Substanz von den Aflatoxinen wird eine dünn-schichtchromatographische Entwicklung bei 40°F empfohlen mit der Verwendung von 9 % Methanol in Chloroform als Fließmittel.

Zur Erfassung des Aflatoxingehaltes im Käse entwickelten KIERMEIER und GROLL (1969) mit Chloroform als Lösungsmittel ein Verfahren der "Heiß-Extraktion" im Soxhlet-Apparat. Bei der anschließenden dünn-schichtchromatographischen Aufarbeitung der Extrakte von im Handel befindlichen Käse ließen sich die Reifungsprodukte der Käseherstellung nur sehr schwer auftrennen. Das traf besonders für Käse mit Schmierebildung zu (KIERMEIER, 1970). Deshalb ist hier die zweidimensionale Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms unerlässlich.

Eine "Kalt-Extraktion" mit Acetonitril erwies sich als vorteilhafter. Bei dieser Art Methode reicht eine eindimensionale Auftrennung im allgemeinen für den Nachweis aus. Jedoch wurde später festgestellt, daß auch hierbei fluoreszierende Produkte der Käse-reifung das Vorhandensein von Aflatoxin B_1 vortäuschen können (KIERMEIER, 1970; KIERMEIER und BÖHM, 1971).

Bei der Extraktion von Rohkaffee und nachfolgender dünn-schichtchromatographischer Auftrennung erscheint im Chromatogramm ein Kaffeeinhaltsstoff, das Scopoletin, welches im UV-Licht intensiv hellblau fluoresziert (THIER et al., 1968). Der Rf-Wert dieses Stoffes unterscheidet sich allerdings von dem des Aflatoxin B_1 . Da aber diese Verbindung in der Natur weit verbreitet vorkommt und als ein Inhaltsstoff verschiedener Pflanzen auftritt, besteht die Möglichkeit, daß das Scopoletin (6-methoxy-7-hydroxy-cumarin) dennoch bei Anwendung anderer Methoden den Nachweis von Aflatoxin B_1

stört.

Die Aflatoxinbestimmung in Kaffee, Tee und Kakao wird erschwert durch die Inhaltsstoffe Koffein, Theobromin und Xanthophyll, weil zumindest die ersteren zwei mit dem Lösungsmittel extrahierbar sind, welches zur Extraktion der Aflatoxine Verwendung findet. Sie erscheinen dann auch im Dünnschichtchromatogramm als mit Aflatoxin B_1 interferierende Stoffe (CAMPBELL, 1967).

Blau fluoreszierende Flecke im Dünnschichtchromatogramm, die KEPLER und DE JONGH (1964) bei Auftrennung von einem aus Kakao-bohnen gewonnenen Extrakt beobachteten (s.S. 42), sind vermutlich auf das Vorhandensein von Theobromin in den Samen der Kakaopflanzen zurückzuführen.

Eine dem Aflatoxin B_2 in den Fluoreszenzeigenschaften, den Rf-Werten und im UV-Absorptionsspektrum ähnliche Verbindung stellt das T-2 dar, welches im Zigarettentabak gefunden wurde (LOURIA, 1971). Lediglich der Schmelzpunkt und ihre Toxizität gegenüber sechs Tage alten Kükenembryonen ist bei beiden Stoffen, Aflatoxin B_2 und T-2, voneinander verschieden.

Ungeklärt ist dabei noch die Frage, ob T-2 auch über karzinogene Eigenschaften verfügt. Da LOURIA T-2 mykologisch nicht weiter charakterisiert hat, kann nur vermutet werden, daß diese Substanz ein Fusariumtoxin darstellt.

2.2.7 Antioxydantien

Es nimmt nicht wunder, daß bei der großen Zahl mit den Aflatoxinen interferierender Stoffe vor allem der Mykotoxinnachweis im Mischfutter Schwierigkeiten bereitet. Neben den natürlich vorkommenden Stoffen erweisen sich zur Konservierung zugesetzte Antioxydantien als erhebliche Störfaktoren, die es auszuschalten gilt (SCHULTZ und MOTZ, 1967).

Antioxydantien werden bewußt zum Schutz oxydationsfreudiger Verbindungen eingesetzt (KOLB, 1970). Veränderungen in Futtermitteln unterliegen bei Zutritt von Sauerstoff in der Hauptsache ungesättigte Fettsäuren, die Vitamine A und E, Karotine und Karoti-

noide (Xanthophylle). Vornehmlich bei der Haltbarmachung von Milchprodukten (ADDA, 1963), Milchaustauschstoffen, sowie von Mischfutter für die Geflügelhaltung (KOLB, 1970) hat sich der Einsatz von Antioxydantien bewährt. Geflügelmischfutter, charakterisiert durch den hohen Anteil an Getreideprodukten, verlangt auf Grund des sich daraus ergebenden hohen Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren einen solchen Zusatz, um lagerungsfähig zu sein. Es gilt dabei auch die für die Dotterpigmentbildung wichtigen Karotine und Xanthophylle zu erhalten.

Da die Tokopherolverbindungen des Getreides zum großen Teil nicht die stärker wirksame Komponente des Vitamin E, das α -Tokopherol, enthalten, sondern die weniger wirksamen Tokopherole, kommen den Antioxydantien Bedeutung auch durch ihre Vitamin E-sparende Wirkung zu.

Für das Huhn wird von der MONSANTO CHEMICAL COMPANY, St. Louis, U.S.A. das stickstoffhaltige Antioxydans Ethoxyquin besonders empfohlen (SALLMANN, 1965). Außerdem hat sich Ethoxyquin in der Prophylaxe der Encephalomalazie der Küken bewährt (FRIED, 1968). Als optimale Dosierung des Ethoxyquin für Mischfutter wird eine Menge von 125-150 ppm angesehen (MONSANTO, Werbeschrift).

Um bei Futterfetten wie Rindertalg und Schweineschmalz die Lagerungsfähigkeit zu erhöhen, werden Antioxydantien in Mengen von 150-200 g/t Fett zugesetzt (KELLNER und BECKER, 1966). Auf diese Weise können primär gebildete Hydroperoxyde abgefangen werden. Da bei diesem Prozeß die Antioxydantien einem Abbauprozess unterliegen (KOLB, 1970), bereiten sie bei einer späteren Aflatoxinanalyse anscheinend Schwierigkeiten.

Der relativ hohe Zusatz von Antioxydantien (400-750 ppm Ethoxyquin) bei Fischmehl wird mit einem Gehalt bis zu 10 % ungesättigter Fettsäuren in diesem Futtermittel begründet, für welchen ein Oxydationsschutz gewährleistet sein muß (KNAPSTEIN, 1967). KOLB (1970) gibt sogar Mengen bis zu 800 ppm an. Durch den Zusatz von Antioxydantien wird gleichzeitig die biologische Wertigkeit der Fischmehlproteine erhöht.

Antioxydantien wie Butylhydroxyanisol (BHA) und Butylhydroxytoluol (BHT) werden in Konzentrationen von 50-200 ppm Futter- und Nahrungsmitteln zugesetzt. In der Chromatographie hat sich das

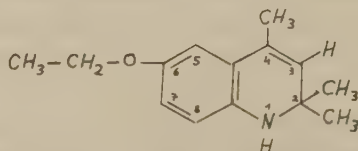
BHT als nützlich erwiesen, um Lipide an der Autoxydation während des Arbeitsvorganges und der Lagerung zu hindern (WREN und SZCZEPANOWSKA, 1964).

Von KWON und AYRES (1967) wurde BHT eingesetzt, um reines Aflatoxin G_1 mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie zu erhalten. Sie verwendeten dazu mit 0,02 % BHT stabilisiertes Chloroform als Elutions- und Entwicklungsmittel und präparierten DC-Platten mit EDTA (Äthylendiamintetra-Essigsäure). Dadurch wurde erreicht, daß die Anzahl der bei der Anwendung üblichen Verfahren als störend beobachteten Nebenfluoreszenzen und deren Intensität herabgesetzt war. Die Banden des Aflatoxin G_1 stellen sich dabei gelb, bzw. grün fluoreszierend dar; das BHT erscheint im UV-Licht als dunkler Fleck nahe der Fließmittelfront.

Eine weitere Möglichkeit, Antioxydantien zur Detoxifikation von Aflatoxinen eventuell einzusetzen, ergab sich bei Beobachtungen von TRAGER und STOLOFF (1967). In Versuchen, Aflatoxine durch oxydierende Reagenzien zu entgiften, wurde festgestellt, daß Chinone (0,01 M) sämtliche Aflatoxine innerhalb von fünf Minuten nach Eintritt eines Kontaktes zerstören. Da Chinone im Zusammenhang mit einer Oxydation natürlicher und zugesetzter Antioxydantien entstehen, erscheint es lohnend, ihre Wirkung auf den Abbau von Aflatoxinen in Lebens- und Futtermitteln zu verfolgen (GOLD-BLATT, 1969).

Zur Erfassung der Antioxydantien sind verschiedene Verfahren entwickelt worden, für die chemisch-physikalische Eigenschaften herangezogen werden.

Ethoxyquin (Äthoxyquin, Äthoxyquinolin, Santoquin, Kurasan) stellt das synthetische Antioxydans 2,2,4-Trimethyl-6-äthoxy-1,2-dihydrochinolin dar, für welches folgende Strukturformel zutreffend ist.



Ethoxyquin

Es liegt als hellbraune, viskose, fett- und alkohollösliche, in Wasser unlösliche Flüssigkeit vor, die zu 70 % aus reinem Wirkstoff und maximal 30 % p-Phenetidin besteht. Es hat ein spezifisches Gewicht von 1,036-1,042; der Siedepunkt liegt nach Angaben von WEBER (1967 a) zwischen 280-285°C, nach BRÜGGEMANN und ZENTZ (1963) bei 125°C (1-2 mm Hg). Als Schmelzpunkt wird ~ -10°C angesehen; der Refraktationsindex lautet n_D^{25} 1,57. Zur Bestimmung von Santoquin^R in Futtermitteln liegt von BRÜGGEMANN und ZENTZ (1963) eine Methode vor, die die Basis weiterer Ethoxyquinbestimmungsverfahren in Futter und Futterzusätzen der Firma MONSANTO bildet (firmeneigener Forschungsbericht). Das Ethoxyquin wird aus der Untersuchungsprobe mit Hilfe von Petroläther quantitativ extrahiert und seine Eigenfluoreszenz mit einem geeigneten Fluoreszenzmeßgerät bestimmt.

Den Nachweis störender Stoffe aus Futtermitteln wie z.B. Karotine, Xanthophylle und andere Pflanzenpigmente vor allem aus Grünmehl, die durch ihre Petrolätherlöslichkeit in die Extrakte gelangen und die Eigenfluoreszenz des Santoquin^R unterdrücken, können von den Antioxydantien durch Chromatographie mit Aluminiumoxyd abgetrennt werden.

Je nach Art des zu analysierenden Futters empfiehlt das MONSANTO-Forschungsteam eine andere Methodik für Alfalfa^N, Fischmehl und Geflügelfutter, sowie für Fette und Öle.

Verfahren zur Rückgewinnung von Ethoxyquin aus Eiern, Kükenmuskeleis und Kükenlebern geben VAN DEREN und JAWORSKI (1966 und 1967) an.

Von SEHER (1959) liegt ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zum analytischen Nachweis synthetischer Antioxydantien in Speisefetten vor, die die Auftrennung aller gebräuchlichen Stoffe erlaubt und natürliche Begleitstoffe als eventuelle Störfaktoren ausschaltet. Eine Steigerung der Empfindlichkeit dieses Verfahrens wird durch die Sichtbarmachung der chromatographisch getrennten Substanzen mit Phosphormolybdänsäure erreicht. Er entwickelte auch eine Auswertungsschablone, die bei eigenen Experimenten Anwendung fand (vgl. S. 90).

Für die Antioxydantien BHA, BHT, PG (Propylgallate) und NDGA (Nordihydroguajretsäure) stehen dünnschichtchromatographische Bestimmungsmethoden von SAHASRABUDHE (1964) und von SCHEIDT und CONROY

(1966) zur Verfügung.

Mit der spektrophotometrischen Bestimmung von BHA und BHT in Salatölen befaßte sich JOHNSON (1967).

STEFANIAK (1969) beschäftigte sich bereits eingehend auch mit der sich in Gegenwart des Antioxydans Ethoxyquin mit Aflatoxin B_1 ergebenden Interferenz. Sie führte Versuche mit vier Ethoxyquinproben verschiedener Herkunft durch, die sie in Chloroform bis zu der Konzentration löste, die in der Intensität der Fluoreszenz mit der des Aflatoxin B_1 -Standards übereinstimmte. Sie verwendete drei verschiedene Ausführungen von DC-Platten und bediente sich zehn differierender Fließmittelsysteme zum Studium des Verhaltens der Rf-Werte des Ethoxyquin im Vergleich zum Aflatoxin B_1 . Zusätzlich überprüfte sie die Ethoxyquinproben nach Vorreinigung über eine Chromatographiesäule die Reaktion des Antioxydans mit Sprühreagenzien, sowie dessen Verhalten im UV-Absorptionsspektrum. Bei Verwendung einer mit 0,25 mm beschichteten Kieselgel G-DC-Platte erschien bei drei der vier untersuchten Ethoxyquinproben nach der Auftrennung das Antioxydans nicht als einheitlicher, scharf abgrenzbarer Fleck, sondern es zeigte sich eine Schwanzbildung und ein Auftreten von zwei separaten Punkten bei Anwendung von 15 % Aceton in Chloroform bzw. Chloroform-Aceton-n-Hexan (85:15:20) als Fließmittel. Letzteres führte zu der Schlußfolgerung, daß das Antioxydans chemisch nicht als einheitlicher Stoff angesprochen werden kann. Vielmehr mehrere nebeneinander vorkommende chemische Verbindungen dürften für die interferierende Fluoreszenz verantwortlich sein. Die Richtigkeit der Interpretation der Befunde konnte mit Hilfe der Spektrophotometrie bestätigt werden. Es stellte sich heraus, daß noch nicht näher definierte Unreinheiten des Ethoxyquin Aflatoxin B_1 -ähnliche Fluoreszenzen hervorrufen.

Eine Ausschaltung der Interferenz gelingt, wenn eine zweite Entwicklung der DC-Platte in Äthyläther vorgenommen und die Platte mit 5 % Salpetersäure besprüht wird. Aflatoxin B_1 verfärbt sich im Gegensatz zu den Ethoxyquinunreinheiten, die unverändert bleiben, gelb. Ferner soll die Möglichkeit bestehen, durch Vorreinigung des Extraktes über eine Chromatographiesäule mit Petroläther oder Methanol-Chloroform als Elutionsmittel die störenden Beimen-

gungen des Ethoxyquin zu beseitigen.

Entsprechend der Verwendung der Antioxydantien nicht nur für die Konservierung von Lebens- und Futtermitteln, sondern z.B. auch für Autobenzin, Farben, Seifen, Plastikgegenständen oder zur Stabilisierung von Medikamenten (VOLLUM, 1971; MEHLHORN und BEETZ, 1971), liegen Untersuchungen zur Frage der Toxizität dieser Verbindungen für Mensch und Tier vor.

In der Dermatologie wurden Fälle bekannt, bei denen Antioxydantien als Noxe von Hautveränderungen in Betracht gezogen werden. Nach Behandlung von Psoriasis und Ekzemen mit Steroidsalbe und einem schützenden Polyäthylenfilm, der einen gewissen Prozentsatz BHT enthielt, trat Hypomelanosis auf. Da es sich hierbei um Patienten schwarzer Hautfarbe handelte, bei welchen die Depigmentation sehr deutlich zutage trat, wird vermutet, daß Veränderungen der Haut bei Patienten heller Hautfarbe durch diese Stoffe bislang un bemerkt blieben (VOLLUM, 1971).

Ethoxyquin als Ursache eines arbeitsbedingten Kontaktekzems wurde bei einem Futtermitteldosierer festgestellt. Eine Epikutantestung sicherte diesen Befund ab (MEHLHORN und BEETZ, 1971).

Bei gezielten Untersuchungen des Verhaltens des Ethoxyquin im tierischen Organismus durch MACHLIN et al. (1957) wurde nach oraler Verabreichung von radioaktiv markierten Santoquin^R (2,4-C¹⁴) festgestellt, daß junge Hunde und Küken die nahezu vollständig applizierte Menge an Ethoxyquin (1-40 bzw. 150 ppm) innerhalb von 24 Stunden wieder ausschieden. Die Struktur des Antioxydans blieb dabei intakt; keines der Tiere baute Santoquin^R ab. Ein kleiner, in Leber, Nieren und Fettgewebe zurückbleibender Rest wurde nach dem Absetzen des Stoffes auch noch vom Körper eluiert. Gleichartige Beobachtungen liegen von Affen, Kälbern, Schweinen und Lämmern vor. WILSON et al. (1959) gelangten zu ähnlichen Ergebnissen nach Verabreichung von Santoquin-C¹⁴ an Kühe und Ratten.

Die Toxizität des Ethoxyquin überprüften WILSON und DE EDS (1959) näher durch Applikation via Magensonde von 20 und 50 μ gigen Ethoxyquinlösungen in Baumwollsaatöl an Ratten entsprechend den Mengen von 125-1000 mg Ethoxyquin pro kg Körpergewicht. Als einziges Symptom akuter oraler Toxizität ließ sich bei den Tieren eine Depression feststellen, die am zweiten Tag einsetzte und vier bis

fünf Tage andauerte.

Eine akute intraperitoneale und intravenöse Toxizität des Antioxydants für Mäuse wurde bei einem Versuch mit Ethoxyquin-Tween 80 (1:1) festgestellt, welches in physiologischer Kochsalzlösung zur Erlangung einer 2 oder 5 %igen Emulsion suspendiert worden war. Die bei Ratten beobachtete Depression setzte bei den Mäusen viel heftiger ein. 1000 mg/kg KGW intraperitoneal injiziert, riefen bei diesen Aufregungszustände, unsicheren Gang und ein anschließendes Zusammenbrechen innerhalb von fünf Minuten post inj. hervor. Einige Minuten später lagen die Tiere im Coma; fünf von sieben Mäusen starben. Bei Verabreichung einer Dosis von 800 mg/kg KGW und weniger überlebten die Tiere und waren am folgenden Tag völlig symptomfrei. Als LD₅₀ wurden 178 mg/kg KGW ermittelt.

Eine Testung der chronischen Toxizität erfolgte an abgesetzten Albinoratten. Dabei konnte von den Tieren ethoxyquinhaltiges Futter ad libidum innerhalb bestimmter Perioden aufgenommen werden. Eine 0,2-0,4 %ige Diät verursachte Nieren-, Leber- und Schilddrüsenveränderungen bei männlichen Ratten nach 400 Tage langer Applikation. 0,2 % Ethoxyquin, über 717 Tage aufgenommen, bewirkte ähnliche Veränderungen, aber schwächer ausgeprägt. Weibliche Ratten erwiesen sich gegenüber ihren männlichen Artgenossen als resistenter.

Zwei Wochen lang täglich in einen Tropfen Öl in die Kaninchen- und Meerschweinchenhaut verriebenes unverdünntes Ethoxyquin rief leichte Erytheme und anschließend papulöse Veränderungen sowie z.T. Schorfbildungen hervor. Nach Beendigung des Versuches heilten die entzündlich veränderten Hautstellen wieder ab. Gelöst injiziertes Ethoxyquin führte zu keinen Hautveränderungen.

Da Santoquin^R vor allem Geflügelfutter zugesetzt wird, interessierte die Verträglichkeit des Antioxydants im Vogelorganismus bei Überdosierung. Von WEBER (1967 a) wurden hierfür fünf Tage alte Hühnerküken als Testobjekte verwendet und industriell hergestelltem Kükenaufzuchtfutter pro Tier/Tag 0-16 mg Ethoxyquin acht Wochen lang zugesetzt. Das entspricht einer Überdosierung bis zu 77 %. Unter der Verabreichung war weder eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes, noch verminderte Körpergewichtszunahme zu verzeichnen. Histologisch-pathologische Veränderungen an den Organen Gehirn, Leber, Dünndarm und Nieren waren nicht feststellbar.

An fünf Tage alten Entenküken der Pekingenten-Rasse mit Ethoxyquin

und dem Kokzidiostatikum Furazolidon durchgeführte Verträglichkeitsversuche (WEBER, 1967 b) ließen ebenfalls keinen Einfluß des Santoquin^R auf die Entwicklung der Tiere erkennen.

Eine dritte Versuchsreihe (WEBER, 1972) mit der Verabreichung von Furazolidon (100 mg/kg Futter) und Ethoxyquin (120 mg/kg) an Mastkühen hatten dagegen einen depressiven Einfluß auf Wachstum und Entwicklung der Kühen zur Folge. Dieser war jedoch nicht reproduzierbar, wenn nur eine der beiden Testsubstanzen an Mastkühen verabreicht wurde. Im Gegenteil eine Wachstums- und Entwicklungsstimulation trat ein. Die bei gleichzeitiger Aufnahme von Furazolidon und Santoquin^R beobachteten Erscheinungen sind vermutlich auf Störungen des Vitaminhaushaltes der Versuchstiere zurückzuführen und lassen sich nicht in eine direkte Beziehung zur Toxizität der einzelnen Verbindungen setzen.

Somit verhält sich das die Aflatoxinanalyse beeinflussende Ethoxyquin in Konzentrationen, wie sie im Futter vorliegen können, im Toxizitätstest keineswegs charakteristisch. Derartige zusätzliche Prüfungen zur Identifizierung einer fraglichen Substanz dürften nur unter der Voraussetzung von Bedeutung sein, wenn die zur Aflatoxin B₁-Bestimmung geeigneten biologischen Testobjekte ein eindeutiges Untersuchungsergebnis liefern.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Experimente zur Nachweisbarkeit von Mykotoxinen mit Hilfe empfindlicher Bakterienstämme als Testorganismen

3.1.1 Prüfung von Reinsubstanzen in Mischfutter zu erwartender Mykotoxine im Agar-Lochtest

3.1.1.1 Material und Methodik

Die einzelnen Mykotoxine (vgl. Tab. 7) wurden in kristalliner Form in Mengen von 1000 oder 2000 μg abgewogen und unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln oder Salzlösungen in Lösung gebracht. In Vorversuchen wurde die Konzentration der Lösungsmittel Propylenglykol (PG), N,N-Dimethylformamid (DMF), physiologische Kochsalzlösung und Earle'sche Salzlösung ermittelt, die für die einzusetzenden Bakterienstämme noch unschädlich ist.

Zur Gewinnung abgestufter Toxinkonzentrationen diente Rinder-Amnionflüssigkeit (RAF) oder auch Earle'sche Salzlösung. Die damit entsprechend einer geometrischen Reihe hergestellten Verdünnungen reichten bis zu Stufe III, bzw. V oder VI, entsprechend den Toxinkonzentrationen von 100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 3,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium.

Da die Pilzgifte in den das Bakterienwachstum nicht beeinträchtigenden Lösungsmittelkonzentrationen teilweise nicht voll in Lösung gingen, war es bei schlechter Löslichkeit der Substanz nur möglich, eine Testung in Suspension vorzunehmen. Der Vorgang der Lösung konnte allerdings nach Zugabe von Propylenglykol oder Dimethylformamid durch leichtes Erwärmen mit auf Sparflamme gestellten Bunsenbrenner ohne Schädigung des Toxins noch in manchen Fällen erreicht werden, wenn bei Zimmertemperatur kein Erfolg zu erzielen war.

Zur Kontrolle wurde jeweils das reine Lösungsmittel in der zur Lösung verwendeten Menge innerhalb einer jeden Testreihe mitgeprüft.

Tabelle 7: Detaillierte Angaben über die Vorbereitung der einzelnen Mykotoxine für die Prüfung auf ihre antibiotische Aktivität im Agar-Lochtest

Mykotoxin (Herkunft)	Ausgangs- menge in µg	Lösungsmittel Art	Menge in ml	Lös- lich- keit	Verdünn- ungs- stufen
Aflatoxin	2000	PG + RAF	0,2+0,8	+	I - V
B ₁ +G ₁	1000	DMF + E	0,1+0,05	+	
(ROTH)					
Aflatoxin B ₁	2000	PG + RAF	0,5+0,5	+	I - III
(MAKOR)	1000	DMF + E	0,05+0,05	-	
Aflatoxin G ₁	1000	DMF + RAF	0,1+0,4	+	I - III
(MAKOR)	1000	DMF + RAF	0,05+0,05	-	
Ochratoxin A	1000	DMF + RAF	0,1+0,4	-	I - VI
(MAKOR)	1000	DMF + RAF	0,05+0,05	+	
Diacetoxyscirpenol	1000	DMF + RAF	0,1+0,4	+	I - VI
(MAKOR)	1000	DMF + E	0,05+0,05	-	
Sterigmato-	1000	DMF + RAF	0,1+0,4	-	I - VI
cystin	1000	DMF	0,1	-	
(MAKOR)					
Rubratoxin B	1000	DMF + RAF	0,1+0,4	-	I - VI
(MAKOR)	1000	DMF + RAF	0,05+0,05	+	
Byssochlamin-	1000	DMF + RAF	0,1+0,4	-	I - VI
säure	1000	DMF + RAF	0,05+0,05	-	
(REHM)					
Kojisäure	1000	E	0,5	+	I - VI
(SCHUCHARDT)	1000	E	0,1	+	
Oxalsäure	1000	NaCl	0,5	+	I - VI
(MERCK)	1000	NaCl	0,1	+	
Mesoxalsäure	1000	NaCl	0,5	+	I - VI
(SCHUCHARDT)	1000	NaCl	0,1	-	

Erklärung zu Tabelle:

ROTH = Carl ROTH, Karlsruhe
 MAKOR = MAKOR CHEMICALS LTD, Jerusalem
 SCHUCHARDT = Dr. Theodor SCHUCHARDT, München
 REHM = Prof. Dr. H.-J. REHM, Münster
 MERCK = E. MERCK, Darmstadt

Lösungsmittel: PG = Propylenglykol; DMF = N,N-Dimethylformamid;
 E = Earle'sche Salzlösung; NaCl = physiologische Kochsalzlösung

Löslichkeit: + = gute; + = mittlere; - = schlechte

Für den Nachweis antibiotisch wirksamer Substanzen wurde von der Firma OXOID, England das Antibiotica-Medium No. 1 und 2 (CODE CM 327 und CM 335) mit folgender Zusammensetzung entwickelt:

Medium No. 1 (Seed Agar)		Medium No. 2 (Base Agar)	
pro Liter	in Gramm	pro Liter	in Gramm
Pepton (OXOID L34)	6,0	Pepton (OXOID L34)	6,0
Trypton (OXOID L42)	4,0	Hefe Extrakt (OXOID L21)	3,0
Hefe Extrakt (OXOID L21)	3,0	"Lab-Lemco" Beef Extrakt	1,5
"Lab-Lemco" Beef Extrakt	1,5	Agar No. 1	10,0
Dextrose	1,0		
Agar No. 1	10,0		
pH 6,5	25,5 g/l Aqua dest.	pH 6,5	20,5 g/l Aqua dest.

Eine Mischung aus beiden Medien wurde als Nährsubstanz für die Testkeime (15 ml pro Glas-Petrischale mit Durchmesser 8,5 cm) verwendet.

Bei den Teststämmen handelte es sich um den Stamm *Staphylococcus aureus* SG 511, sowie um je einen Vertreter der Arten *Escherichia coli* (0:86), *Bacillus cereus* und *Bacillus subtilis*, die sich gegenüber den gebräuchlichen Antibiotika in Vorversuchen als sensibel erwiesen hatten.

Diese Teststämmen wurden jeweils in Standardbouillon I von MERCK bei 37°C 16 Stunden vorkultiviert und von der bewachsenen Bouillon nach Verdünnung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung jeweils eine Öse zur Beimpfung einer Nähragarplatte entnommen. Nach Ausspateln dieser Impfmenge auf der Oberfläche des Nährbodens erfolgte das Ausstanzen von drei bis vier Löchern je Agarplatte mit Hilfe eines abgeflamten Glasrohres (d = 0,8 cm). In jedes dieser Löcher wurde dann ein Tropfen (= 0,05 ml) der zu prüfenden Lösung pipettiert.

Im Falle der Prüfung der Toxine in Konzentrationen von 1000 µg erwies es sich als zweckmäßig, die Toxinkristalle direkt in die Stanzlöcher zu geben und erst anschließend das Lösungsmittel zuzusetzen. Bei den Suspensionen wurde entsprechend den Lösungen verfahren.

Nach einer Diffusionszeit von einer Stunde bei Zimmertemperatur wurden die Testplatten bei 37°C bebrütet. Im Anschluß daran erfolgte die Auswertung.

Es sei noch erwähnt, daß besonderer Wert darauf gelegt wurde, für die Testung der Mykotoxine keine Petrischalen aus Kunststoff zu verwenden, denn Lösungsmittel wie DMF greifen dieses Material an, und Aflatoxine werden innerhalb kurzer Zeit von diesen Stoffen absorbiert (SCOPPA und MARAFANTE, 1971).

3.1.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Die bei diesen Versuchen erhaltenen Testergebnisse wurden in Tabellen zusammengefaßt (s. Tab. 8-11).

Die in der ersten Versuchsreihe getesteten Toxinkonzentrationen von 100-3,12 µg erwiesen sich gegenüber den verschiedenen Testkeimen als nur gering oder überhaupt nicht antibiotisch wirksam. Hemmeffekte traten unter der Einwirkung der Aflatoxine nur in einer Konzentration von 100 µg in Erscheinung. Sie waren in Gegenwart von Aflatoxin $B_1 + G_1$ gegenüber *B. subtilis* und *Staph. aureus* nachweisbar, während reines Aflatoxin B_1 nur *B. subtilis* in dieser Konzentration hemmte. Aflatoxin G_1 übte in Konzentrationen bis zu 100 µg überhaupt keinen wachstumshemmenden Einfluß auf die verschiedenen Arten von Testkeimen aus. Dagegen erwies sich Ochratoxin A bereits in einer Konzentration von 50 µg als antibiotisch aktiv. Unter der Einwirkung der anderen Mykotoxine unterblieb in allen Konzentrationen eine Hemmhofbildung.

Auf Grund dieser Resultate wurde bei einem zweiten Versuch die Konzentration der Toxine auf 1000 µg erhöht. Unter dieser Voraussetzung zeigten außer Aflatoxin B_1 und Ochratoxin A noch Kojisäure, Oxalsäure und Rubratoxin B eine antibiotische Aktivität, wenn auch nicht in jedem Falle gegenüber allen Testkeimen (s. Tab. 8-11). Trotz zehnfach höherer Beschickung der ausgestanzten Löcher waren jedoch die Hemmhöfe in Gegenwart von Aflatoxin $B_1 + G_1$ nur geringfügig größer. In der hohen Konzentration wurden von Aflatoxin B_1 und Ochratoxin A jeweils beide *Bacillus*-Arten gehemmt. Aflatoxin G_1 erwies sich in einer Menge von 1000 µg als antibiotisch inaktiv. Der geprüfte *E. coli*-Stamm sprach am wenigsten auf die getesteten Toxine an. Eine Wachstumshemmung war bei diesem Testkeim nur in Gegenwart der Säuren Kojisäure und Oxalsäure festzustellen, was allein schon auf einer Verschiebung des pH in den stark sauren Bereich beruhen kann.

Nach den vorliegenden Testergebnissen ist demzufolge von den toxischen Stoffwechselprodukten von Schimmelpilzen eher eine Hemmwirkung gegenüber grampositiven als gegenüber gramnegativen Bakterienarten zu erwarten. Als eine Bestätigung hierfür kann die Arbeit von MEISER (1968) angesehen werden. Sie fand bei In-vitro-Versuchen, daß durch *Aspergillus flavus* verpilztes Futter in der Darmflora von Tieren die grampositiven Keimarten, nicht aber die gramnegativen Bakterienarten an einer Vermehrung gehindert werden. Bei *E. coli* war sogar ein wachstumsstimulierender Effekt zu verzeichnen.

Die bei eigenen Untersuchungen mit dem Agar-Lochtestverfahren erhaltenen Resultate stehen nur zum Teil im Einklang mit den Angaben, die in der Literatur über antibiotische Aktivität von Mykotoxinen zu finden sind.

CLEMENTS (1968 a, b) und JAYARAMAN et al. (1968) berichten von einer Wachstumshemmung des *B. megaterium* in Gegenwart von 1 µg Aflatoxin B₁, 8 µg Aflatoxin G₁ oder 4-8 µg Aflatoxin B₁+B₂+G₁+G₂-Gemisch. Bei Anwendung der Papierblättchenmethode fanden JAYARAMAN et al. (1968) auch Hemmeffekte in geringeren Konzentrationen im Falle von Koji- und Oxalsäure. 16 µg Oxalsäure oder 10 µg Kojisäure reichten aus, das Wachstum des Testkeimes zu unterdrücken. Ochratoxin A hemmte nach BROCE et al. (1970) *B. cereus* var. *mycoides* in einer Dosierung von 1,5 µg. Bei einer Prüfung der Sensibilität von *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* und *E. coli* u.a. gegenüber Sterigmatocystin stellten LILLEHOJ und CIEGLER (1968) keinen Hemmeffekt in Konzentrationen von 100 µg fest. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) bei Rubratoxin B gegenüber *Bacillus* spp. (u.a. *B. subtilis*), *Micrococcus* spp. und *Staph. aureus* lag nach Untersuchungen von HAYES und WYATT (1970) bei 1000 µg/ml.

Alle Autoren benutzten die Technik, die auf einem Verfahren beruht, das für den Wirkungsnachweis von Antibiotika entwickelt wurde (u.a. GROVE und RANDALL, 1955). Sie prüften die Empfindlichkeit der Bakterienstämme durch Auflegen von mit der zu prüfenden Lösung getränkten Filterpapierscheiben auf den mit dem Testkeim beimpften Agar.

Möglicherweise ist von dieser Technik eine höhere Ansprechbarkeit der Testkeime als im Falle der Anwendung der Lochtestmethode, bei

welcher das Konzentrationsgefälle größer ist, zu erwarten (KLEIN 1957). Da aber die Toxine zum Teil nur ungenügend in Lösung gingen wurde dieser Methode bei der Testung der reinen Toxine im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Vorzug gegeben. Bei späteren Versuchen wurde dieser Tatsache Rechnung getragen, in dem die Testkeime zur Verbesserung des Kontaktes zwischen den Reagenten in das Medium eingemischt wurden.

Da bei den eigenen Versuchen mit dem Gemisch aus Aflatoxinen eine höhere Ansprechbarkeit erzielt wurde, als mit den gereinigten Einzelkomponenten Aflatoxin B₁ und G₁, können unterschiedliche Reinigungsgrade der Toxine auch die voneinander abweichenden Testergebnisse bestimmt haben.

Tabelle 8: Empfindlichkeit des *Bacillus cereus*-Stammes gegenüber abgestuften Konzentrationen verschiedener Mykotoxine im Agar-Lochtest

Mykotoxine	Geprüfte Konzentrationen in µg								Kontrolle	
	1000	100	50	25	12,5	6,25	3,12		K ₁	K ₂
Aflatoxin B ₁ +G ₁	14	-	-	-	-	-	-		-	-
Aflatoxin B ₁	10	-	-	-					-	-
Aflatoxin G ₁	-	-	-	-					-	-
Ochratoxin A	17	16	13	-	-	-	-		-	-
Diacetoxy-scirpenol	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Sterigmato-cystin	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Rubratoxin B	10	-	-	-	-	-	-		-	-
Byssochlamin-säure	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Kojisäure	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Oxalsäure	16	-	-	-	-	-	-		-	
Mesoxalsäure	-	-	-	-	-	-	-		-	-

Zeichenerklärung: s.S. 60

Tabelle 9: Empfindlichkeit des *Bacillus subtilis*-Stammes gegenüber abgestuften Konzentrationen verschiedener Mykotoxine im Agar-Lochtest

Mykotoxine	Geprüfte Konzentrationen in µg								Kontrolle	
	1000	100	50	25	12,5	6,25	3,12		K ₁	K ₂
Aflatoxin B ₁ +G ₁	13	10	-	-	-	-			-	-
Aflatoxin B ₁	11	10	-	-					-	-
Aflatoxin G ₁	-	-	-	-					-	-
Ochratoxin A	16	-	-	-	-	-	-		-	-
Diacetoxy-scirpenol	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Sterigmato-cystin	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Rubratoxin B	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Byssochlamin-säure	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Kojisäure	11	-	-	-	-	-	-		-	-
Oxalsäure	17	-	-	-	-	-	-		-	-
Mesoxalsäure	-	-	-	-	-	-	-		-	-

Zeichenerklärung: s.S. 60

Tabelle 10: Empfindlichkeit des *Escherichia coli*-Stammes der 0-Gruppe 86 gegenüber abgestuften Konzentrationen verschiedener Mykotoxine im Agar-Lochtest

Mykotoxin	Geprüfte Konzentrationen in µg								Kontrolle	
	1000	100	50	25	12,5	6,25	3,12		K ₁	K ₂
Aflatoxin B ₁ +G ₁	-	-	-	-	-	-			-	-
Aflatoxin B ₁	-	-	-	-					-	-
Aflatoxin G ₁	-	-	-	-					-	-
Ochratoxin A	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Diacetoxyscirpenol	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Sterigmatozystin	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Rubratoxin B	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Byssoschlamin-säure	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Kojisäure	10	-	-	-	-	-	-		-	-
Oxalsäure	17	-	-	-	-	-	-		-	-
Mesoxalsäure	-	-	-	-	-	-	-		-	-

Zeichenerklärung: s. S. 60

Tabelle 11: Empfindlichkeit des Stammes *Staphylococcus aureus* SG 511 gegenüber abgestuften Konzentrationen verschiedener Mykotoxine im Agar-Lochtest

Mykotoxin	Geprüfte Konzentrationen in µg							Kontrolle	
	1000	100	50	25	12,5	6,25	3,12	K ₁	K ₂
Aflatoxin B ₁ +G ₁	11	10	-	-	-	-	-	-	-
Aflatoxin B ₁	9	-	-	-	-	-	-	-	-
Aflatoxin G ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ochratoxin A	16	13	10	-	-	-	-	-	-
Diacetoxyscirpenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sterigmato-cystin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rubratoxin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Byssochlamin-säure	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kojisäure	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxalsäure	15	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesoxalsäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung zu den Tabellen 8-11:

Zahlenangaben = Hemmhofdurchmesser in mm

- = Hemmeffekt nicht nachweisbar

K₁ = Kontrolle zur geprüften Konzentration 1000 µg

K₂ = Kontrolle zu den geprüften Konzentrationen < 1000 µg

3.2 Testung von aus Mischfutter hergestellten Extrakten mit unterschiedlichen Verfahren

3.2.1 Material

1. Kontaktmethode (Abklatsch- oder Reprint-Verfahren)

Verwendet wurden hierzu 0,2 ml einer Aflatoxin $B_1 + G_1$ -Standardlösung der Firma ROTH mit einem Gehalt von $4 \mu\text{g } B_1$ und $0,75 \mu\text{g } G_1$, aufgenommen in 1,8 ml Chloroform p.a., ferner 0,25 mm dick beschichtete, 20x20 cm große Kieselgel 60-Glasplatten (DC-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator der Firma MERCK), eine Mikropipette (HAMILTON-Spritze 0,1 ml), DESAGA-Auftragschablone, DC-Entwicklungskammer, Chloroform p.a. und Methanol als Fließmittel, Filterpapier, eine Universal-UV-Lampe (350 nm) der Firma CAMAG, sowie Antibiotica-Medium No. 1 und 2 (OXOID) gemischt (vgl. S. 54) und als Testkeime *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, SG 511.

2. "Umgekehrte" Direktmethode

Außer einem zusätzlichen Glasschneider wurde das gleiche Material wie für die Kontaktmethode benötigt.

3. Direktmethode

20 Extrakte, hergestellt aus 15 verschiedenen Mischfuttermitteln und vier unterschiedlichen Einzelfuttermitteln, wurden neben Aflatoxin $B_1 + G_1$ -Standardlösung der Firma ROTH zur Erprobung dieses Verfahrens eingesetzt. Dabei wurden aus einem Einzelfuttermittel zwei Extrakte gewonnen, nämlich vor und nach der Anreicherung mit Schimmelpilzen. Weitere Daten über dieses Material sind Tabelle 12 zu entnehmen. Weiterhin waren erforderlich Chemikalien und Apparate, wie sie für das Extraktionsverfahren nach PONS et al. (1966) benötigt werden, die übliche DC-Ausrüstung, zusätzlich ein Chromatocharger (CAMAG), kleiner Spachtel, Aluminiumfolie, Watte, Messingrahmen 22,5 (Außenmaß) x 2,0 (Breite) x 1,0 (Höhe) in cm. Als Testkeime diente ein freundlicherweise von FRANK überlassener Stamm des *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (empfindlich gegenüber allen gebräuchlichen Antibiotika) und als Medium Blood Agar Base (OXOID), da dieser Nährboden bei Vorversuchen gute

Wachstumsergebnisse mit diesem Bakterienstamm ergeben hatte.

4. Agar-Lochtest

Die gleichen 20 Extrakte aus den Futtermitteln, die mit der Direktmethode getestet wurden, fanden auch Verwendung bei der Anwendung des Agar-Lochtestes. Außerdem wurden damit 15 weitere Extrakte geprüft, die zu diesem Zweck aus 13 anderen Mischfutter- und zwei Einzelfuttermitteln hergestellt worden waren. Detaillierte Angaben zu diesen Futtermitteln liegen in Tabelle 13 vor. Die DC-Aufarbeitung, sowie die Durchführung des Plattendiffusionstestes erfolgte mit dem gleichen Material wie bei der Direktmethode. Zusätzlich wurde ein Glasrohr ($d = 1,7$ cm), N,N-Dimethylformamid und Rinder-Amnionflüssigkeit benötigt.

Tabelle 12: Angaben über Vorkommen von Schimmelpilzen, Aflatoxin B₁-Gehalt und dünn-schichtchromatographisches Verhalten der mit der Direktmethode und dem Agar-Lochtest untersuchten Misch- und Einzelfuttermittel

Tabelle 12: Angaben über Vorkommen von Schimmelpilzen, Aflatoxin B₁-Direktmethode und dem Agar-Lochtest untersuchten Misch-

Laufende Nr.	Mischfuttermittel für	Schimmelpilze Gehalt Art	Nach DC errechneter Gehalt an Aflatoxin B ₁ *
1.	Geflügel (Mehl)	Voruntersuchung: 2,0x10 ⁴ /g R.nigricans A.niger P.citrinum, Nachuntersuchung: 1,8x10 ⁵ /g Mucoraceae R.nigricans P.citrinum S.brevicaulis	0,067 ppm
2.	Geflügel (Mehl)	Voruntersuchung: 1,3x10 ⁵ /g Penicillien u.a. Nachuntersuchung: 7,8x10 ³ /g R.nigricans A.niger P.citrinum	0,1 ppm 0,1 ppm
3.	Geflügel (Mehl)	Voruntersuchung: 2,0x10 ³ /g Mucoraceae (+rote Pigmentbildner) P.citrinum Nachuntersuchung: 5,0x10 ⁴ /g Mucoraceae A.niger A.flavus P.citrinum	0,1 ppm
4.	Geflügel (Mehl)	2,0x10 ⁴ /g Mucoraceae Aspergillen Penicillien	0,133 ppm
5.	Geflügel (Mehl)	7,0x10 ⁴ /g A.flavus Penicillien	0,111 ppm
6.	Geflügel (Mehl)	1,3x10 ⁵ /g Aspergillen (u.a. A.candidus) P.niger	0,167 ppm
7.	Geflügel (Mehl)	3,2x10 ⁵ /g A.glaucus-G. Penicillien	0,08 ppm

Gehalt und dünn-schicht-chromatographisches Verhalten der mit der
und Einzelfuttermittel

Fluoreszenzen nach Auftrennung mit Methanol in Chloroform (3:97)
Rf-Werte ϕ d. Fluores- Farbtöne Aflatoxin B₁ - Stand.
zenz in cm Rf-Wert ϕ d. Fl.

0.15	0,6	bv+lila (+)	0.58	0,8
0.43	0,8	hell bv		
0.60	1,0	bv (+)		

0.14	0,9	bv+lila	0.60	0,9
0.43	0,6	hell bv		
0.57	1,0	b wie Stand.		

0.15	0,7	rosalila (-)	0.65	0,8
0.44	1,0	hell bv		
0.62	1,0	bv		

0.15	0,7	bv+lila	0.51	0,8
0.40	0,7	bv		
0.50	0,9	bv (+)		
0.60	0,8	hell bv	0.72	0,9
0.70	1,0	bv (+)		
0.07	0,5	hell v	0.47	0,8
0.34	0,7	hell b		
0.44	0,9	bv		

0.08	0,6	rosalila (-)	0.42	0,8
0.30	0,8	hell b		
0.40	1,0	bv		

Fortsetzung Tabelle 12:

Laufende Nr.	Mischfutter- mittel für	Schimmelpilze Gehalt	Art	Nach DC errech- neter Gehalt an Aflatoxin B ₁ *	
8.	Geflügel (Mehl)	$2,6 \times 10^3$ /g	Mucoraceae A. niger Penicillien (u.a. P. citri- num)	0,3	ppm
9.	Geflügel (Mehl)	$1,8 \times 10^3$ /g	Mucoraceae R. nigricans Penicillien (u.a. P. citri- num)	0,5	ppm
10.	Geflügel (Mehl)	nicht näher	spezifiziert	0,2	ppm
11.	Geflügel (Mehl)	$4,0 \times 10^4$ /g	A. candidus A. flavus P. citrinum	/	
12.	Schweine (Mehl)	$5,0 \times 10^4$ /g	u.a. rote Pigment- bildner	0,067	ppm
13.	Milch- aus- taucher	$8,2 \times 10^3$ /g	A. candidus Penicillien	0,006	ppm
14.	Milch- aus- taucher	nur Hefen	$3,0 \times 10^8$	/	
15.	Fische (Mehl)	$6,0 \times 10^3$ /g	A. niger Penicillien	3,0	ppm

Fluoreszenzen nach Auftrennung mit Methanol in Chloroform (3:97)

Rf-Werte ϕ d. Fluoreszenz in cm Farbtöne Aflatoxin B₁ - Stand. Rf-Wert ϕ ¹d. Fl.

0.28	0,7	bv→lila	0.83	0,9
0.65	0,8	hell b		
0.80	1,0	bv (+)		

0.25	0,7	bv→lila	0.82	0,9
0.65	0,9	hell bv		
0.80	1,0	bv		

0.10	0,6	rosalila	0.47	0,7
0.33	0,8	hell b		
0.45	0,8	bv (-)		

0.14	0,5	rötl.lila	0.50	0,5
0.25	0,7	grün		
0.38	0,5	bv		
0.49	1,2	bv (+)		

0.12	0,6	lila	0.50	0,7
0.36	0,7	hell b		
0.48	1,0	bv		

0.12	0,6	hellgrün	0.43	0,7
0.40	1,5	bv		

0.11	0,6	grünlich	0.50	0,6
0.17	0,5	rost		
0.39	0,5	bv (-)		

0.47	0,9	bv		
0.60	0,7	rost		

0.80	1,0	b	0.82	0,9
------	-----	---	------	-----

*

Die Berechnung des Aflatoxin B₁-Gehaltes in ppm erfolgte nach der von PONS et al. (1966 a) angegebenen Formel:

$V \times Y \times Z : W \times X \times 0,6$

(V = Gesamtvolumen des gelösten Extraktes in μ l;

Y = Toxinkonzentration in der Standardlösung in μ g/ μ l;

Z = Menge der Standardlösung, die mit der Fluoreszenz des Probefleckes übereinstimmt;

W = Gewicht der Probe in g;

X = aufgetragene Menge des Extraktes in μ l.)

Fortsetzung Tabelle 12:

Laufende Nr.	Einzelfutter- mittel	Schimmelpilze		Nach DC errech- neter Gehalt an Aflatoxin B ₁
		Gehalt	Art	
16.	Erdnußmehl	$> 10^6 \pm 10^7 / g$	Mucoraceae Aspergillen (u.a. A. fla- -vus)	0,666 ppm
17.	Erdnußmehl	$2,0 \times 10^2 / g$	A. flavus u.a.	0,666 ppm
18.	Hafercreme	$2,0 \times 10^2 / g$	A. glaucus-G.	/
19.	Hafercreme Nr. 18	Anreicherung:	R. nigricans A. glaucus-G.	/
20.	Silage	$1,4 \times 10^6 / g$	Mucoraceae A. candidus P. rubrum u.a.	/

Fluoreszenzen nach Auftrennung mit Methanol in Chloroform (3:97)

Rf-Werte	Ø d. Fluores-	Farbtöne	Aflatoxin B ₁ - Stand.
	zenz in cm		Rf-Wert Ø ¹ d. Fl.

0.18	0,6	hell bv (+)	0.75	0,6
0.33	0,6	bv-lila		
0.61	0,4	grünlich		
0.74	1,0	b wie Stand.		
0.10	0,5	lila (-)	0.48	0,6
0.19	0,6	lila (-)		
0.47	1,1	b wie Stand.		
0.50	0,8	grün (-)	0.55	0,8
0.20	0,7	bv (-)	0.50	0,8
0.45	2,0	bv (+)		
0.13	0,6	grünlich	0.47	0,7

Tabelle 13: Angaben über Vorkommen von Schimmelpilzen, Aflatoxin B₁-
mit dem Agar-Lochtest untersuchten Misch- und Einzel-

Laufende Nr.	Mischfutter- mittel für	Schimmelpilze Gehalt	Art	Nach DC errech- neter Gehalt an Aflatoxin B ₁
21.	Geflügel (Pell.)	$\leq 10^2/g$	nicht näher spezifiziert	0,056 ppm
22.	Geflügel (Mehl)	$8,0 \times 10^4/g$	Mucoraceae A.candidus A.flavus Fusarien	0,02 ppm
23.	Geflügel (Pell.)	$1,0 \times 10^4/g$	Mucoraceae P.citrinum S.brevi- caulis	0,056 ppm
24.	Geflügel (Mehl)	$1,0 \times 10^4/g$	Mucoraceae A.flavus Monascus sp.	/
25.	Geflügel (Mehl)	$5,0 \times 10^2/g$	Mucoraceae	0,133 ppm
26.	Geflügel (Mehl)	$2,0 \times 10^4/g$	Mucoraceae Monascus sp.	0,067 ppm
27.	Geflügel (Mehl)	$3,0 \times 10^4/g$	Mucoraceae A.flavus Monascus sp.	/
28.	Geflügel (Mehl)	$8,0 \times 10^4/g$	Monascus sp.	0,013 ppm
29.	Fische (Pell.)	$1,3 \times 10^6/g$	A.glaucus-G. Penicillien	/
30.	Schweine (Mehl)	$8,0 \times 10^2/g$	Mucoraceae	0,044 ppm

Gehalt und dünn-schicht-chromatographisches Verhalten der zusätzlich Futtermittel

Fluoreszenzen nach Auftrennung mit Methanol in Chloroform (3:97)				
Rf-Werte	Ø d. Fluores- zenz in cm	Farbtöne	Aflatoxin B ₁ - Stand. Rf-Wert	Ø ¹ d. Fl.
0.40	0,9	b wie Stand.	0.43	0,6
0.25	0,8	grünlich	0.47	0,8
0.36	0,7	hell bv		
0.44	0,6	bv (-)		
0.09	0,2	grünlich (-)	0.45	0,8
0.12	0,3	grau		
0.35	0,7	bv-grau		
0.44	0,9	bv (+)		
0.12	0,7	lila	0.40	0,7
0.32	0,5	hell bv		
0.40	1,2	bv		
0.12	0,6	lila	0.39	0,6
0.30	0,6	hell bv		
0.40	0,9	bv		
0.23	0,8	lila	0.73	0,5
0.60	0,8	hell bv		
0.70	1,0	bv		
0.17	0,6	lila	0.47	0,7
0.38	0,5	hell bv		
0.48	0,9	bv		
0.15	0,8	lila	0.50	0,9
0.38	0,6	hell bv		
0.48	1,0	dunkel bv		
0.17	0,5	grau	0.53	0,5
0.51	0,9	bv		
0.08	0,5	lila	0.34	0,6
0.24	0,5	hell bv		
0.33	0,8	bv		

Fortsetzung Tabelle 13:

Laufende Nr.	Mischfutter- mittel für	Schimmelpilze		Nach DC errech- neter Gehalt an Aflatoxin B ₁
		Gehalt	Art	
31.	Rinder (Mehl)	2,1x10 ⁵ /g	Mucoraceae A. candidus Penicillien (u.a. P. ci- trinum)	0,278 ppm
32.	Rinder (Mehl)	2,1x10 ⁵ /g	Mucoraceae A. candidus A. niger A. flavus A. glaucus-G. P. citrinum	0,067 ppm
33.	Rinder (Mehl)	1,0x10 ⁴ /g	Mucoraceae A. niger Penicillien	0,04 ppm
Einzelfutter- mittel				
34.	Körnermais	3,0x10 ² /g	A. candidus	/
35.	Hafterschalen	ohne Befund		/

Die in Tabelle 12 und 13 angegebenen Futtermittel wurden dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München zur Mykotoxinanalyse eingesandt.

Zeichenerklärung zu Tabelle 12-13:

b = blau; bv = blauviolett; bv+lila = blauviolett ins lila gehend;
(+) = stark fluoreszierend; (-) = schwach fluoreszierend;
Pell. = Pellets; Stand. = Standard; Fl. = Fluoreszenz;
/ = negativ

Fluoreszenzen nach Auftrennung mit Methanol in Chloroform (3:97)

Rf-Werte ϕ d. Fluores- Farbtöne Aflatoxin B₁ - Stand.
 zenz in cm Rf-Wert ϕ^1 d. Fl.

0.19	0,7	lila	0.65	0,8
0.33	0,4	graugrün		
0.40	0,6	grün		
0.52	0,8	hell bv		
0.67	0,8	bv		
0.15	0,4	lila	0.52	0,8
0.25	0,4	graugrün		
0.30	0,4	grün		
0.40	0,6	hell bv		
0.50	0,9	bv		
0.21	0,9	grau b (-)	0.66	0,8
0.51	0,6	hell b (-)		
0.69	0,6	bv (-)		

0.10	0,6	grünlich	0.41	0,7
0.27	0,6	b	0.38	1,0
0.39	0,9	dunkelgrün		

3.2.2 Methoden

1. Kontaktmethode (Abklatsch- oder Reprint-Verfahren)

WALLHÄUSSER schlägt im Handbuch der Dünnschichtchromatographie von STAHL (1967) zur Bestimmung von Antibiotika unter anderem den mikrobiologischen Test in Form der Kontaktmethode vor.

Um die Eignung dieser, auch als Abklatsch- oder Reprint-Verfahren bezeichneten, Methode für den Nachweis antibiotisch wirksamer Mykotoxine zu testen, wurden keine Futtermittlextrakte, sondern eine, in ihrer Zusammensetzung bekannte, Aflatoxin $B_1 + G_1$ -Standardlösung eingesetzt.

Mengen von 25, 100 und 150 μ l dieser Standardlösung wurden mit einer HAMILTON-Spritze punktförmig auf eine Kieselgel-DC-Platte 2 cm oberhalb der Plattenbasis aufgetragen. Eine Auftragschablone erleichterte das Auftropfen. Zur Auftrennung der Aflatoxine wurde die DC-Platte in einen unausgekleideten, mit Chloroform-Methanol (97:3) gesättigten Tank gestellt. Eine Sättigung der Kammer wird bei Zimmertemperatur erreicht, wenn das Fließmittel ca. 15-30 Minuten vor der Verwendung in den Tank gefüllt wird. Die Entwicklung der Platte erfolgte bis zur Laufhöhe des Fließmittels von 10 cm. Danach wurde sie luftgetrocknet und auf ihr die unter langwelligem UV-Licht fluoreszierenden Flecke mit Bleistift markiert.

Im Anschluß daran wurden Filterpapierstreifen ungefähr in Größe der Fluoreszenzflecke zugeschnitten, das Ausmaß der Flecke darauf mit Bleistift gezeichnet und das Papier für ungefähr 20 Minuten in Chloroform getränkt. Sofort danach wurde es auf die entwickelte DC-Platte gelegt und diese, um die Verdunstung des Lösungsmittels zu vermeiden, in einen verschlossenen Glasbehälter gegeben. Nach einigen Minuten Einwirkungszeit wurde das Filterpapier dem Behälter entnommen und luftgetrocknet für 20 Minuten auf die mit den Testkeimen beimpften Agarplatten gelegt. Nach Entfernung des Papierstreifens wurden die Agarplatten 16 Stunden bei 37°C bebrütet.

In einem Parallelversuch wurde das Filterpapier nicht entfernt und über die Bebrütungszeit von 16 Stunden auf dem Agar belassen.

Die gleiche Technik wurde bei allen drei Teststämmen *B. cereus*, *B. subtilis* und *Staph. aureus*, SG 511 angewendet, und die Agarplatten wie für die Durchführung des Plattendiffusionsverfahrens mit der Lochtestmethode vorbereitet (s.S. 54), lediglich das Aus-

stanzen von Löchern unterblieb.

2. "Umgekehrte" Direktmethode

Als "umgekehrt" wurde folgende Methode deswegen bezeichnet, da sie im Prinzip der von WALLHÄUSSER (1967) angegebenen Direktmethode entspricht, der Arbeitsvorgang aber umgekehrt abläuft.

Nach Markierung der Fluoreszenz des Aflatoxin B_1 und G_1 auf entwickelter DC-Platte wurden mit Hilfe eines Glasschneiders Rechtecke in der Größe herausgeschnitten, die gut in eine Petrischale von 8,5 cm Durchmesser paßten. Die in der Hauptsache die Fluoreszenzflecke der Toxine aufweisenden Plattenstückchen wurden dann entweder die gesamte Bebrütungszeit von ca. 16 Stunden über auf den beimpften Nährmedien belassen oder bereits nach 20 Minuten Diffusionszeit wieder von der Agaroberfläche abgenommen.

3. Direktmethode

Das Verfahren beruht auf dem direkten Übersichten der DC-Platte mit Nähragar, in welchem nach dem Verflüssigen im Dampftopf und Abkühlen bis auf 40°C vor dem Ausgießen bereits der Teststamm eingeeimpft wird (WALLHÄUSSER, 1967). FRANK (1971) modifizierte dieses ursprünglich für den routinemäßigen Nachweis von Antibiotika erarbeitete Verfahren zur Erfassung der Mykotoxine und empfiehlt anstelle einer Agarschicht zwei Agarschichten zu verwenden: Eine unbeimpfte Agarschicht stellt den direkten Kontakt zur DC-Platte her; eine zweite enthält erst den Testkeim, welcher die Gegenwart von Mykotoxinen anzeigen soll.

Auch bei der Überprüfung dieser Methode wurde als erstes mit Aflatoxin B_1+G_1 -Standard gearbeitet. Mengen von 150, 100 und 25 µl Lösung wurden dazu punktförmig auf eine DC-Fertigplatte (seitlicher Abstand 4 cm, Abstand von der Grundlinie 2 cm) aufgetragen und diese in einem unausgekleideten Tank mit dem Fließmittel Chloroform-Methanol (97:3) bei Zimmertemperatur bis zu einer Lauflänge von 10 cm entwickelt.

Eine Menge von 50 µl Aflatoxin B_1+G_1 -Standardlösung wurde auch strichförmig unter Zuhilfenahme eines Chromatochargers aufgetragen und mit dem gleichen Fließmittel entwickelt. Es erwies sich jedoch bei dieser Auftragsart als erforderlich, für die nachfol-

gende Entwicklung die Kammer auszukleiden. Dazu eignet sich zu-
rechtgeschnittenes Filterpapier, dessen Halt durch einen dünnen
Drahtrahmen gesichert wurde. Die Kammersättigung ist dadurch ver-
bessert, das sog. "Randphänomen" konnte vermieden werden (STAILL,
1967).

Die Anordnung der Fluoreszenzen der Aflatoxine wurde jeweils unter
langwelligem UV-Licht markiert. In ähnlicher Weise wurden die mit
Hilfe der PONS et al.-Methode (1966 a) aus verschiedenen Futter-
mitteln gewonnenen Extrakte dünnschichtchromatographisch aufge-
arbeitet. Die Futtermittelauszüge wurden nach Aufnahme in 0,5 ml
 CHCl_3 in Mengen zu 50 μl strichförmig aufgetragen. Zur Kontrolle
wurden jeweils 10 μl Aflatoxin $\text{B}_1 + \text{G}_1$ -Standardlösung am Rand der
DC-Platte aufgetropft. Im Anschluß an die Auftrennung der Extrakte
mit Chloroform-Methanol (97:3) als Fließmittel wurden wiederum
die Fluoreszenzen unter UV-Licht markiert, die im Aflatoxin B_1 -
Bereich liegenden eluiert und die Eluate erneut entwickelt.

Zur Gewinnung der Eluate wurde die DC-Platte jeweils auf ei-
nen großen Bogen Aluminiumfolie gelegt und im Bereich der ange-
zeichneten Fluoreszenz mit einem kleinen Spatel das Kieselgel ab-
gekratzt. Von der Folie wurde dann das Kieselgel in ein Becherglas
überführt, auf der Platte und der Folie verbleibende Spuren mit
in Chloroform getränkter Watte aufgenommen und die Watte eben-
falls in das Glasgefäß gegeben. Nach Zugabe von 100 ml CHCl_3 und
leichtem Schütteln von Hand wurde die Chloroformlösung mit Hilfe
einer Aeromat-Pumpe abgesaugt und mit 50 ml CHCl_3 nachgewaschen.
Es erfolgte dann eine Einengung des Eluates im Vakuumrotations-
verdampfer.

Zur Beschichtung der entwickelten DC-Platte mit Agar wurde diese
plan auf eine Metallplatte gelegt. Ein schwerer Messingrahmen ver-
hinderte das Abfließen des Agars, welcher, auf 40°C abgekühlt, in
einer Menge von 100 ml über das Chromatogramm gegossen wurde. Dem
Nährmedium waren 0,2 ml *B. stearotheophilus* var. *calidolactis*-
Suspension beigelegt worden, die in der Dichte einer Bariumsulfat-
aufschwemmung 97:3, hergestellt aus 97 ml 1/10 m H_2SO_4 + 3 ml
1/20 m BaCl_2 , entsprach. 0,2 ml Suspension der vegetativen Formen
hatte sich als die geeignetste Einsaatmenge erwiesen und ersparte
die Herstellung von Sporenaufschwemmungen.

Nach Erstarren des Agars wurde der Metallrahmen von oben mit einer

Glasplatte abgedeckt und die auf diese Weise entstandene "Schale" (s.u.) zur Diffusion für eine Stunde in einen Kühlschrank bei 4°C gestellt. Es erfolgte anschließend eine Bebrütung für 16 Stunden und zwar bei 65°C, da bei dieser Temperatur von dem Testkeim optimales Wachstum zu erwarten ist, und Fremdinfectionen auf diese Weise unterdrückt werden konnten.



- 1 Glasplatte
- 2 Rahmen
- 3 Agar
- 4 DC-Platte
- 5 Metallplatte

Auf den Zusatz von TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) zur besseren Sichtbarmachung eventueller im Agar auftretender Hemmzonen (vgl. NICOLAUS et al., 1961; WALLHÄUSSER und RIPPEL-BALDES, 1950) wurde verzichtet, da der *Bacillus* das TTC nur geringgradig zu rotem Triphenylformazan reduzierte.

Eine Erleichterung der Auswertung wurde erreicht durch die Markierung der Fluoreszenz auf der Rückseite der Chromatographieplatte mit einem farbigen Glasschreiber, denn sie ist nach der Bebrütung durch Platte und Agar hindurch wahrnehmbar. Somit konnte festgestellt werden, ob Hemmzonen im Bereich der aufgetretenen Fluoreszenzen lagen.

Beim Überschichten der DC-Platte wurde besondere Aufmerksamkeit darauf verwendet, daß die Kieselgel-Schicht keine Kratzer aufwies, andernfalls löst sich nämlich das Gel bei Zufügen des Agars ab und macht eine spätere Auswertung unmöglich.

4. Agar-Lochtest

Von dem Nährmedium wurden jeweils 16 ml in eine Glaspetrischale gegossen. Nach dem Erkalten des Agars erfolgte die Beimpfung der Platten mit je zwei Ösen der *Bacillus*-Suspension und das Ausstanzen von Löchern aus dem Agar mit dem abgeflamten Glasrohr. Die Eluate, sowie die ungereinigten Extrakte (Restmengen, die zur Chromatographie nicht benötigt wurden) wurden jeweils in 0,1 ml DMF + 0,1 ml RAF aufgenommen und in die Stanzlöcher pipettiert. Eine Lösung, bestehend aus 0,1 ml DMF + 0,1 ml RAF, diente als Kontrolle und wurde jeweils parallel mitgeprüft. Die Diffusionszeit betrug eine Stunde bei 4°C im Kühlschrank, die Bebrütungsdauer 16 Stunden bei 65°C.

3.2.3 Ergebnisse und deren Besprechung

3.2.3.1 Kontaktmethode (Abklatsch- oder Reprint-Verfahren)

Beim ersten Versuch, diese Methode für den Nachweis der Aflatoxine einzusetzen, wurden nur negative Resultate erzielt. Obwohl die DC-Platte mit einer reinen Toxinlösung beschickt worden war, ließ sich kein Wachstumshemmeffekt der Testkeime feststellen. Vermutlich waren die 20 Minuten Diffusionszeit zu kurz, um einen Übertritt des Toxins von der DC-Platte in den Chloroform-getränkten Filterpapierstreifen zu gewährleisten, da auch im Anschluß daran noch Fluoreszenzen unter der UV-Lampe (350 nm) wahrgenommen werden konnten. Unter Umständen bestehen generell Schwierigkeiten bei dieser Art von Diffusion, möglicherweise bedingt durch eine zu geringe Kapillarität des verwendeten Filterpapiers.

Beim zweiten Versuch, bei welchem das Filterpapier während der Bebrütungszeit von 16 Stunden auf dem Agar belassen wurde, kam es ebenfalls zu keiner Hemmzonenbildung.

Allerdings waren auch die Toxinmengen relativ klein.

Da einerseits wegen der Flüchtigkeit des Chloroforms zur Erreichung einer besseren Diffusion ein längeres Auflegen des Filterpapiers auf die DC-Platte nicht möglich war und andererseits angestrebt wurde, eine Methode herauszufinden, mit welcher auch noch kleine Toxinmengen erfaßt werden können, erschien eine weitere Erprobung der Kontaktmethode für den Mykotoxinnachweis als nicht lohnenswert.

3.2.3.2 "Umgekehrte" Direktmethode

Wenn bei der Anwendung dieses Verfahrens die zurechtgeschnittenen Plattenstücke 16 Stunden auf dem Agar belassen wurden, entsprach das Ergebnis dem Resultat der Kontaktmethode.

Bei der Beschränkung der Diffusionszeit auf 20 Minuten stellte sich beim Entfernen der DC-Plattenteile folgende Schwierigkeit ein: Es ließ sich zwar das Glas abnehmen, die Kieselgel-Schicht blieb aber auf dem Agar haften, so daß wiederum keine brauchbaren Resultate erzielt werden konnten.

Es wurde daraufhin toxinhaltiges Kieselgel von der DC-Platte abgekratzt und dieses direkt auf seine bakterienhemmende Wirkung

untersucht. Wie reines Kieselgel, das als Kontrolle diente, übte es keinen wachstumshemmenden Einfluß auf die Testkeime aus.

3.2.3.3 Direktmethode

Bei der Überprüfung der Direktmethode wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt.

Eine Hemmung des *Bacillus*-Wachstums im Bereich der Aflatoxin B₁-Fluoreszenz war lediglich bei der punktförmigen Auftropfung von 150 µl des Aflatoxinstandards zu verzeichnen, während kleinere Mengen, 100 und 25 µl punktförmig, sowie 50 µl strichförmig aufgetragen, das Wachstum des Testkeimes nicht beeinträchtigten.

Die Testung der antibiotischen Aktivität von Futtermittlextrakten lieferte allgemein unbefriedigende Resultate, wofür verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht werden können. Die Testergebnisse sind im einzelnen der Tabelle 14 und Abbildung 6 zu entnehmen.

Tabelle 14: Ergebnisse der Untersuchung der antibiotischen Aktivität von Futtermittlextrakten bei Anwendung der Direktmethode

Laufende Nr. des Futtermittel- extraktes	Hemmung des <i>B. stearo- thermophilus</i> <i>var. calidolactis</i>	Laufende Nr. des Futtermittel- extraktes	Hemmung des <i>B. stearo- thermophilus</i> <i>var. calidolactis</i>
1.	-	11.	-
2.	-	12.	-
3.	-	13.	+
4.	-	14.	-
5.	-	15.	+
6.	-	16.	-
7.	+	17.	+
8.	+	18.	-
9.	+	19.	+
10.	-	20.	-

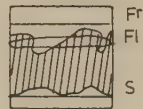
Zeichenerklärung: - = keine Hemmung; + = teilweise Hemmung;
+ = vollständige Hemmung

Abb. 6: Schematische Darstellung der Hemmeffekte bei Anwendung der Direktmethode

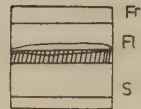
Nr. des Futtermittel-
extraktes

Bioautogramm

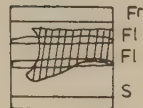
7.



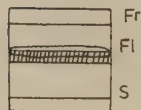
8. und 9.



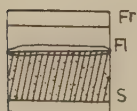
13.



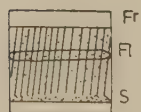
15.



17.



19.



Zeichenerklärung:

□ = diffuses Wachstum; ■ = Einzelkolonien;

▨ = kein Wachstum

Fr = Lauffront; Fl = Fluoreszenz; S = Startlinie

Soweit überhaupt bei der Anwendung dieser Technik eine Hemmung des Bakterienwachstums nachzuweisen war, stand sie in keinerlei Beziehung zu dem mit Hilfe der dünnsschichtchromatographischen Auswertung kalkulierten Gehalt an Aflatoxin B₁ in den Futtermittel-extrakten (vgl. Tab. 12). Die Zonen ohne Bakterienwachstum traten aber auch unabhängig von der Art und Zusammensetzung des Futters auf. Es handelte sich dabei dreimal um Mischfutter für Geflügel und je einmal um Hafercreme, Milchaustauscher und Erdnuß- sowie Fischmehl. Auch die Schimmelpilzkeimzahlen verhielten sich in diesen Fällen nicht einheitlich; sie reichten von einem leichten Verderbnisgrad ($>10^2$ /g Futter) bis zur völligen Verderbnis des Futtermittels nach gezielter Verpilzung ($>10^6$ /g). Ebenso bestanden Differenzen in den im Futtermittel nachgewiesenen Pilzarten. Auch ergaben sich keine Anhaltspunkte, daß das Vorkommen bestimmter Schimmelpilzspecies nebeneinander dafür verantwortlich sein könnten.

Bei der Betrachtung der aufgetretenen Hemmzonen fiel auf (s. Abb. 6), daß diese sich nicht nur auf den Bereich der markierten Fluoreszenzen konzentrierten. Das könnte damit erklärt werden, daß außer Mykotoxinen mit Eigenfluoreszenz auch noch andere derartige Stoffe ohne fluoreszierende Eigenschaften im Extrakt vorhanden waren. Da aber im Bioautogramm die Hemmzonen sehr unregelmäßig verteilt waren, spricht die Anzeige mit dem Testkeim nicht unbedingt für das Vorhandensein eines solchen Stoffes. Es wurden bei der Besprechung der Nachweisbarkeit der Mykotoxine im Dünnsschichtchromatogramm bereits hervorgehoben, daß für jede Substanz bestimmte Rf-Werte charakteristisch sind. Es könnten somit eigentlich nur chemisch-physikalische Vorgänge die Ursache der nicht eindeutigen Hemmeffekte sein. Immerhin lagen die Hemmzonen im Bereich der Auftrennung der Stoffe und niemals oberhalb der Lauffront oder unterhalb der Startlinie.

Dessen ungeachtet ist in Betracht zu ziehen, daß gegebenenfalls zur Erzielung klar umrissener Hemmhöfe höhere Mengen von Mykotoxinen erforderlich sind, weil diese allgemein im Gegensatz zu den gebräuchlichen Antibiotika eine geringere Aktivität gegenüber Mikroorganismen entfalten (WALTER und HEILMEYER, 1969; MILLER, 1961; BILAL, 1963; GEDEK, B., 1972; u.a.)

3.2.3.4 Agar-Lochtest

Die Ergebnisse dieser Prüfung wurden in der Tabelle 16 zusammengefaßt. Aus ihr geht hervor, daß alle untersuchten ungereinigten Extrakte, sowie die nach der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung gewonnenen Eluate mit einer Ausnahme (Nr. 14) in der Lage waren, das Wachstum von *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* mehr oder weniger stark zu unterdrücken.

Ungefähr in zweidrittel der Fälle, in denen sowohl Eluate als auch die ungereinigten Extrakte auf ihre antibiotische Aktivität gegenüber dem gewählten Testkeim geprüft worden waren, zeigten die ungereinigten Extrakte stets mit größeren Hemmhofdurchmessern als die daraus gewonnenen Eluate an. Nur in sechs von insgesamt 30 solcher Fälle lag eine Übereinstimmung in den Hemmzonendurchmessern vor, und lediglich in je einem Fall war der Hemmhof bei Testung des Eluates größer als beim vergleichend dazu untersuchten ungereinigten Extrakt, oder das Umgekehrte zeigte sich ab, nämlich das völlige Ausbleiben eines Hemmeffektes bei der Prüfung des Eluates. Letzterer Befund wurde eigentlich weit häufiger erwartet, da die Anzeige antibiotischer Aktivitäten bei Anwendung der Direktmethode ungleich geringer war, und weil angenommen wurde, daß es sich nicht bei jedem geprüften Eluat um ein Mykotoxin handelte.

Die aufgetretenen Hemmeffekte ließen sich abermals nicht in Beziehung setzen zum dünn-schichtchromatographisch ermittelten Aflatoxin B_1 -Gehalt der geprüften Futtermittel (vgl. hierzu Tab. 12 und 13). In den Fällen, bei welchen die Hemmhofdurchmesser von Eluat und ungereinigtem Extrakt sich in Übereinstimmung befanden, war im Dünn-schichtchromatogramm eine dem Aflatoxin B_1 ähnliche blauviolette Fluoreszenz bei der Betrachtung im langwelligen UV-Licht besonders hervorgetreten, so daß diesem Effekt eine additive Wirkung von Aflatoxin B_1 und einem noch näher zu charakterisierenden antibiotischen Stoff zugrunde liegen kann. Bei Ungleichheit der Hemmeffekte von vorgereinigtem Extrakt und Eluat können sowohl biologische als auch chemische Stoffe das Testergebnis beeinflußt und Beimengungen sehr unterschiedlicher Art die größeren Hemmhöfe bei der Testung der ungereinigten Extrakte hervorgerufen haben.

Es zeigte sich, daß Körnermais, welcher keine mykotoxinverdächtigen Fluoreszenzen im Dünn-schichtchromatogramm aufwies, dennoch im Test ein positives Resultat lieferte. Der Extrakt, sowie das Eluat einer

grünen Fluoreszenz riefen eine gleich starke Hemmung des Testkeimes hervor, so daß dieser Effekt auch von Pflanzeninhaltsstoffen her-rühren kann. Eine entsprechende Beobachtung machten nämlich bereits JACQUET et al. (1971). Sie entdeckten bei der dünn-schichtchromato-graphischen Untersuchung von Maniok eine Fluoreszenz, die mit Afla-toxin G₁ interferierte, und deren biologische Aktivität gegenüber *Bacillus stearothermophilus* wesentlich ausgeprägter war als die der Aflatoxine.

Eine Gefahr der Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch Beimengungen nutritiver Antibiotikazusätze zu den Futtermitteln bestand nicht, da einerseits die Behandlung der Extrakte mit hohen Hitzegraden die Zusätze zerstörte, und andererseits Fut-termittel zur Untersuchung kamen, die nachweislich frei von Antibiotikazusätzen waren.

Es besteht aber die Möglichkeit, daß antibiotische Restaktivitäten einzelner Pilze, die sich im Futtermittel angereichert haben, im ungereinigten Extrakt eine zusätzliche Wirkung zu entfalten ver-mochten. FRANK (1972) berichtet von der Wirkung solcher Restakti- vitäten, die das Wachstum der *Bacillus stearothermophilus*-Varietät beeinflußten. Sie wurden nachweisbar bei der Überprüfung mikrobiolo-gischer Verunreinigungen von Enzympräparaten, die zum großen Teil für die Lebensmitteltechnologie aus Pilzen, insbesondere aus *Aspergillus* spp. gewonnen werden. Zur Bestimmung der antibioti-schen Aktivität (MIK) verwendete FRANK Extrakte, die für den Afla-toxinnachweis im wesentlichen nach der gleichen Methode wie die im Rahmen dieser Arbeit geprüften Extrakte hergestellt wurden (PONS et al., 1966 a; FRANK, 1969 b). Danach können derart antibiotisch wirksame Substanzen durchaus enthalten sein und im Test mit an-zeigen.

Schließlich sind es noch Spuren von Chemikalien (besonders von Bleiacetat), die zur Extraktion benötigt werden und die sich so-wohl in ungereinigtem Extrakt als auch in den Eluatn giftig auf Bakterien auswirken können. Um chemische Stoffe als wachstums-hemmenden Faktor eventuell ausschließen zu können, wurden zur Klä-rung dieser Frage ergänzende Untersuchungen eingeleitet. Vier Futtermittel und das reine Antibiotika Medium wurden einmal mit Methanol in Chloroform (7,5:242,5) und zum anderen mit der Methode nach PONS et al. (1966 a) unter Weglassung des Zusatzes von

20 %iger Bleiacetatlösung extrahiert und mit der Lochtestmethode geprüft. Die antibiotische Aktivität der Extrakte ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Antibiotische Aktivität von CHCl_3 -Extrakten im Vergleich zu den nach der PONS et al.-Methode (1966 a) gewonnenen Extrakten

Untersuchungsprobe	Fluoreszenzen bei DC-Auftrennung	CHCl_3 - Extrakt	Hemmhof- ϕ in mm	
			PONS- Extrakt ohne Blei- acetat	Kontrolle (0,2 ml CHCl_3)
1. Erdnußmehl	s.Tab. 12 Extrakt Nr.17	22	21	-
2. Hafercreme, gezielt ver- schimmelt mit <i>A.flavus</i> , St. DORN	sehr schwach fluoreszierende Bänder	-	20	-
3. Hafercreme, gezielt ver- schimmelt mit <i>A.parasiticus</i> , St. CBS 127.62	intensive blaue Fluoreszenz in Aflatoxin B_1 - Nähe	18	23	-
4. Geflügel-Mehl, gezielt ver- schimmelt mit <i>A.flavus</i> , St. DORN	intensive blaue Fluoreszenz in Aflatoxin B_1 - Nähe	19	25	-
5. reines AB- Medium No. 1 (OXOID)	grünliche Bänder	18	24	-

Obwohl es sich hier um "Roh"-Extrakte handelte, sind die Resultate aufschlußreich.

Chloroform-Extrakte der aflatoxinhaltigen Proben Nr. 1 und 3 hemmten *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, jedoch in unterschiedlichem Maße. Ein mit *Aspergillus flavus*, Stamm DORN angereichertes Geflügelfutter (Nr. 4), welches die blauviolette aflatoxinähnliche Fluoreszenz aufwies, bildete einen Hemmhof von 19 mm, während Probe Nr. 2 ein negatives Ergebnis zeigte. Letztere Probe

hatte bei der dünnschichtchromatographischen Beurteilung keine Anzeichen eines Mykotoxingehaltes, zumindest nicht von Aflatoxinen, erkennen lassen. Das Antibiotica Medium (Probe Nr. 5) verursachte, wie zu erwarten, keine vollständige Hemmung des Wachstums des *Bacillus*-Stammes innerhalb eines bestimmten Bereiches.

Bemerkenswert ist, daß die Hemmhofdurchmesser der Probe Nr. 1 trotz unterschiedlicher Extraktionsverfahren sich ähnelten. Bei den Proben Nr. 2-5 (besonders bei Nr. 5) trat deutlich hervor, daß Reste der für die PONS et al.-Methode erforderlichen Extraktions- und Reinigungsmittel eine Wirkung auf das Bakterienwachstum ausüben, unabhängig davon, ob das schwer toxische Bleiacetat zur Extraktion Verwendung fand oder nicht.

Es ist allerdings auch nicht von der Hand zu weisen, daß das Chloroform-Methanol-Gemisch möglicherweise nicht alle die Stoffe aus dem Futtermittel herauslöste, die mit der anderen Methode erfaßt werden, so daß dadurch die antibiotische Wirkung unterdrückt wurde.

Der Einsatz von Chloroform-Extrakten zur Testung der antibiotischen Aktivität mykotoxinhaltiger Futtermittel im Lochtestverfahren ist auch aus einem anderen Grund nicht zu empfehlen, nämlich weil er nicht für alle Futterstoffe geeignet sein kann. Zum Beispiel wirken Gossypol-Pigmente, die im Baumwollsaatmehl anzutreffen sind und bei Anwendung der Methode nach PONS et al. mit Bleiacetat ausgefällt werden können, gegenüber den verschiedenartigsten Mikroorganismen toxisch (MARGALITH, 1967).

Tabelle 16: Ergebnisse der Untersuchung von aus Futtermitteln gewonnener Eluate und Extrakte auf ihre antibiotische Aktivität im Agar-Lochtest

Laufende Nr. des Futtermittels	Eluat d. AflatoxinB ₁ Fluoreszenz	Hemmhof- ϕ in mm		Rf-Wert	andere Eluate Fluoreszenz- farbe	
		ungerei- nigter Extrakt	andere Eluate			
1.	24	20				
2.	26	20				
3.	25	20				
4.	26	22				
5.	/	25				
6.	22	22				
7.	24	23				
8.	/	20	0.64	hell bv		19
			0.25	lila		20
9.	/	20	0.66	hell bv		20
			0.25	lila		21
10.	25	22				
11.	23	20				
12.	26	21				
13.	25	22				
14.	24	-				
15.	/	25				
16.	19	21				
17.	21	19				
18.	22	20	0.49	keine		20
19.	22	19				
20.	21	19				
21.	25	25				
22.	23	20				
23.	24	24				
24.	24	21				
25.	26	20				

Fortsetzung Tabelle 16:

Laufende Nr. des Futtermittels	Eluat d. AflatoxinB ₁ Fluoreszenz	Hemmhof- ϕ in mm			
		ungerei- nigter Extrakt	Rf-Wert	andere Eluate Fluoreszenz- farbe	
26.	25	21			
27.	27	21			
28.	24	20			
29.	24	24			
30.	26	22			
31.	25	20	0.52	hell bv	20
			0.40	grün	19
			0.33	hell gran- grün	21
			0.19	lila	19
32.	21	19			
33.	25	20			
34.	21	21			
35.	26	/			

Die Kontrollen waren in jedem Falle negativ

Zeichenerklärung: / = nicht untersucht
 - = negativ
 bv = blauviolett

3.3 Experimente zur Verbesserung der Identifizierung von im Mischfutter anzutreffenden, nicht von Toxinbildnern herührenden Substanzen

Es wurde bereits bei der Besprechung des Schrifttums darauf hingewiesen, daß von den Antioxydantien, vor allem bei Vorhandensein von Ethoxyquin in Futtermitteln, die Aflatoxin B₁-Bestimmung erschwert sein kann. Es erwies sich als erforderlich, diesen die Aflatoxinanalyse und möglicherweise auch den Nachweis anderer Mykotoxine beeinträchtigenden Faktor näher zu untersuchen und Verfahren zu prüfen, die den Stoff klarer abtrennen von den mykotoxinverdächtigen Substanzen. Immerhin interferiert Ethoxyquin im Dünnschichtchromatogramm nicht nur mit Aflatoxin B₁, sondern auch mit einer blauvioletten Fluoreszenz, die möglicherweise von einem noch nicht näher definierten Mykotoxin herrührt.

Es wurde als erstes überprüft, ob das als Petroläther-löslich beschriebene Ethoxyquin (BRÜGGEMANN und ZENTZ, 1963) mittels des Extraktionsverfahrens nach PONS et al. (1966 a) aus Futtermitteln herausgelöst wird und mit welchen mykotoxikologischen dünn-schichtchromatographischen Verfahren sich dieses Antioxydans überhaupt darstellen läßt. Darüber hinaus wurde verfolgt, auf welche Weise es gelingt, das Ethoxyquin auf dünn-schichtchromatographischem Wege eventuell klarer abzutrennen von den Stoffwechselprodukten der Pilze.

3.3.1 Überprüfung der dünn-schichtchromatographischen Erfassung von Antioxydantien, insbesondere von Ethoxyquin

3.3.1.1 Material und Methodik

Das freundlicherweise vom Vorstand des Institutes für Ernährungsphysiologie der Universität München, Herrn Prof. Dr. Dr. TIEWS überlassene Antioxydans Santoquin^R lag in zwei Aggregatzuständen vor: als feste Substanz entsprechend einer 70 %igen Ethoxyquin-Vormischung (Granulat) und in flüssiger Form (Emulsion).

Zur Herstellung einer Standard-Lösung (STEFANIAK, 1969) wurden 3 mg der Santoquin^R-Vormischung abgewogen und in 1 ml Chloroform, worin es sehr gut löslich ist, aufgenommen (I). Zusätzlich wurde eine

stärker verdünnte Lösung aus 3 mg Ethoxyquin und 5 ml Chloroform hergestellt (II). Das bereits als Flüssigkeit vorliegende Santoquin^R wurde im Verhältnis 1:11 mit Chloroform verdünnt (III).

Als Futtermittelrohstoffe fanden Maisgries und selbst gemahlene Weizenkörner Verwendung, welchen vor Extraktion mit der PONS et al.-Methode (1966 a) unterschiedliche Mengen der 70 %igen Ethoxyquin-Vormischung zugesetzt wurden. Die ausgewählten Rohstoffe hatten bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung keine störenden Fluoreszenzen aufgewiesen. 50 g Maisgries erhielten von dem handelsüblichen Santoquin^R 2 mg, 50 g Weizen 4 mg vor der Extraktion hinzugefügt. Für die punktförmige Auftragung wurden die Extrakte in 1 ml Chloroform, für die strichförmige Auftragung in 0,5 ml Chloroform aufgenommen. Bei Untersuchung des Maisgrieses wurde eine Charge auch mit gleichzeitigem Zusatz vor der Extraktion von Aflatoxin B₁+G₁ (hinzugefügte Menge 4 µg B₁ und 0,75 µg G₁, gelöst in 0,2 ml Chloroform) getestet.

Da vor allem Geflügelfutter einen handelsüblichen Zusatz von Antioxydantien enthält, wurden daraufhin von den Mischfuttermitteln zwei Junghennenalleinfutter (mehlförmig und pelletiert) und ein Kükenalleinfutter (Mehl) für die vergleichenden Untersuchungen ausgewählt, die wiederum nach der Methode nach PONS et al. (1966 a) extrahiert wurden und je 50 g Futtermittel in jeweils 1 ml Chloroform für das Auftragen auf die DC-Platte aufgenommen wurden.

Das Auftragen der unterschiedlich konzentrierten Ethoxyquin-Lösungen, sowie der extrahierten Rohstoffe und Mischfuttermittel auf DC-Fertigplatten erfolgte stets im Vergleich zu 10 µl Aflatoxin B₁+G₁-Standard der Firma ROTH. Beim Auftropfen wurden davon Mengen von 10 µl und 30 µl, beim strichförmigen Auftragen 50 µl verwendet. Die Entwicklung der Platten wurde bei Raumtemperatur stets im unausgekleideten Tank bis zu einer Laufhöhe von 10 cm vorgenommen und dabei folgende Fließmittel eingesetzt:

Chloroform-Methanol (97:3) nach PONS et al. (1966 a);

Aceton-Chloroform (1:9) nach FRANK und EYRICH (1968);

Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5) nach SCHROEDER (1968).

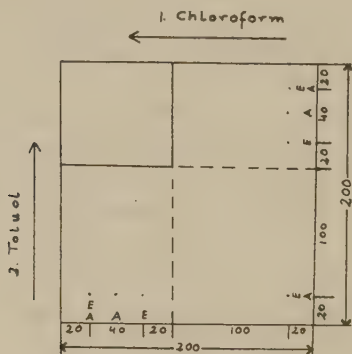
Sie wurden jeweils eine halbe Stunde vor dem Gebrauch hergestellt und höchstens dreimal verwendet.

Die Bewertung der Fluoreszenzen erfolgte unter langwelligem UV-Licht (350 nm).

- Weitere Fließmittel, sowie Joddämpfe wurden ergänzend dazu noch geprüft unter Verwendung von jeweils 10 µl der aus Santoquin^R-Vormischung hergestellten Lösung (I). Es handelte sich dabei um
1. Chloroform-Aceton (180:2) nach BÖSENBERG (1970 b);
 2. Toluol-Äthylacetat-90 %ige Ameisensäure (5:4:1) nach FRANK und EYRICH (1968);
 3. Chloroform-Aceton-Wasser (88:12:1,5) nach STUBBLEFIELD et al. (1969).

In Anlehnung an SEHER (1959), der ein Verfahren zur Bestimmung von synthetischen Antioxydantien unter anderem für Kraftfuttermittel entwickelte, wurde außer der eindimensionalen auch die zweidimensionale Auftrennung von Ethoxyquin versucht. Als Fließmittel dienten für die erste Laufrichtung Chloroform-Methanol (97:3), für die zweite Toluol-Äthylacetat-90 %ige Ameisensäure (5:4:1). Die Konfiguration der aufgetragenen Testsubstanzen (Ethoxyquin-Lösung 10 µl + Aflatoxin B₁+G₁-Standard 10 µl; Aflatoxin B₁+G₁ 10 µl allein; Ethoxyquin 10 µl allein) ist einer Abbildung (s.u.) zu entnehmen.

Abb. 7: Auftragschablone für zweidimensionale DC-Auftrennung von Ethoxyquin im Vergleich mit den Aflatoxinen B₁ und G₁



Zahlenangaben in mm

E = Ethoxyquin

A = Aflatoxin B₁+G₁

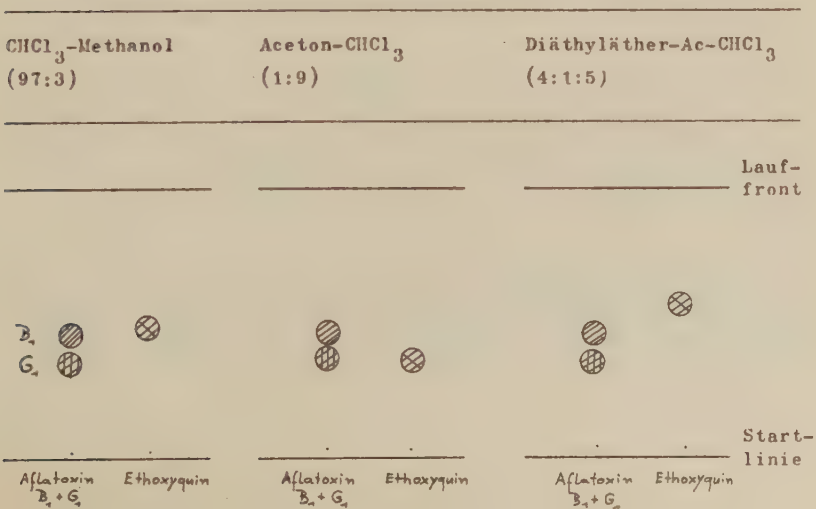
Zur Prüfung der Joddämpfe (MISLIVEC, 1968) wurde elementares Jod auf den Boden eines DC-Tanks gegeben und die entwickelte DC-Platte im Dunkeln für 30-60 Sekunden in die aufsteigenden Dämpfe gestellt und danach im UV-Licht das Verschwinden bzw. das Sichtbarbleiben der Ethoxyquinfluoreszenz beurteilt.

3.3.1.1 Ergebnisse und deren Besprechung

Die aus Handelspräparaten hergestellten Ethoxyquinlösungen zeigten mit einer blauen, mehr ins blauviolette gehenden Fluoreszenz bei den einzelnen Fließmitteln im Vergleich zum Aflatoxin B_1 -Standard unterschiedlich an. Bei Verwendung von Chloroform-Methanol trat sie in Aflatoxin B_1 -Höhe und etwas darüber, bei Aceton-Chloroform einen halben Zentimeter unterhalb B_1 , in Aflatoxin G_1 -Höhe und bei Diäthyläther-Aceton-Chloroform oberhalb B_1 , direkt daran anschließend, auf.

Der Durchmesser der Ethoxyquinfluoreszenz entsprach der der Aflatoxin B_1 -Fluoreszenz unabhängig davon, ob das Auftropfvolumen 10 oder 30 μ l betrug, oder die Lösung stärker oder schwächer konzentriert war. Höchstens in der Intensität der Fluoreszenz waren Unterschiede zu beobachten. Bei der Verwendung der Santoquin^R-Emulsion störten Nebenfluoreszenzen.

Abb. 8: Anordnung des Ethoxyquin im Vergleich zu einem Aflatoxin B_1+G_1 -Standard im Dünnschichtchromatogramm bei Verwendung verschiedener Fließmittel
Bei der Wiedergabe der Fluoreszenzfarben fand der Code nach NYBOM (1967) Anwendung



Nach Zusatz von Ethoxyquin zu Maismehl und Weizenmehl ergaben sich im Dünnschichtchromatogramm gleiche Rf-Werte, lediglich die Fluoreszenzintensität war voneinander verschieden auf Grund höherer Ethoxyquinbeimengungen im Fall des Weizenmehls. Die Tabelle gibt die mit den verschiedenen Fließmitteln erhaltenen Rf-Werte wieder.

Tabelle 17: Rf-Werte der Ethoxyquinfluoreszenzen im Vergleich zu Aflatoxin B₁
In () Durchmesser der Fluoreszenz in cm.

Im DC-Gramm geprüfte Stoffe	Fließmittel		
	1.	2.	3.
Aflatoxin B ₁ -Stand.	0.45 (0,7)	0.20 (0,6)	0.20 (0,6)
Ethoxyquinhaltiger Futtermittlextrakt			
punktförmig	0.47 (0,7)	0.19 (0,5)	0.24 (0,7)
strichförmig aufgetragen	0.45 (0,7)	0.19 (0,5)	0.24 (0,7)

Fließmittel: Chloroform-Methanol (97:3) = 1.
Aceton-Chloroform (1:9) = 2.
Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5) = 3.

Ähnlich wie beim Versuch mit den aus Handelspräparaten hergestellten Ethoxyquinlösungen stimmten die Rf-Werte von Ethoxyquin und Aflatoxin B₁ nach Zusatz des Ethoxyquin zu Futtermittelrohstoffen und Entwicklung in Chloroform-Methanol weitgehend überein. Die Ethoxyquinfluoreszenz lag nur geringgradig höher. Ein Unterschied in den Rf-Werten von einem halben Zentimeter trat bei Anwendung von Aceton-Chloroform als Fließmittel abermals hervor. Lediglich im Diäthyläther-Aceton-Chloroform-Gemisch trennte sich diesmal das Ethoxyquin vom Aflatoxin B₁ ab und lag etwa einen Zentimeter höher.

Punkt- und strichförmiges Auftragen der Extrakte hatte keinen Einfluß auf die Rf-Werte; im ersteren Falle entsprach die Farbe der Fluoreszenz dem Blau des Aflatoxin B₁, im letzteren Falle erschien sie stärker blauviolett.

Im Falle eines Zusatzes von Ethoxyquin und Aflatoxin $B_1 + G_1$ zum Futtermittelrohstoff Maisgries trennten sich Ethoxyquin und die Aflatoxine in den verschiedenen Fließmitteln auf wie die Standards dieser Stoffe.

Bei der Prüfung der Handelsfuttermittel, denen vom Hersteller das Antioxydans zugesetzt war, zeigte Ethoxyquin ein gleichartiges Verhalten bei der Anwendung der drei Fließmittel. Nur bei einer der drei Proben (Junghennenalleinfutter, mehlförmig) ordnete sich das Ethoxyquin unterhalb und nicht im Aflatoxin B_1 -Bereich oder leicht darüber an.

Letztere Feststellung bestätigte die Beobachtung von STEFANIAK (1969), daß Ethoxyquin auf verschiedene Weise die Aflatoxindagnostik erschwert: einmal durch die Überlagerung mit der Aflatoxin B_1 -Fluoreszenz, zum anderen aber auch durch die individuelle Auftrennung von Standardlösung und Extrakt, wie sie sich aus den Schwankungen der Rf-Werte ergibt.

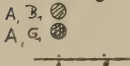
Die Ergebnisse zeigen außerdem, daß das in Petroläther und Chloroform als löslich bekannte Ethoxyquin (BRÜGGEMANN und ZENTZ, 1963), zu Futtermittelrohstoffen gezielt zugesetzt oder vom Händler dem Mischfutter zugefügt, sich nach einer Extraktion mit der PONS et al.-Methode (1966 a) im Auszug dennoch wiederfindet, obwohl in den Vorgang eine Reinigung über eine Chromatographiesäule mit Petroläther eingeschaltet war. Dies widerspricht den Befunden von STEFANIAK (1969). Nach ihren Angaben werden die fluoreszierenden Komponenten des Ethoxyquin mit Hilfe einer Kieselgelsäule mit Petroläther, bzw. Methanol-Chloroform, vollständig entfernt und sollen danach als Störfaktor im Aflatoxin B_1 -Nachweis nicht in Erscheinung treten.

Es fiel beim Arbeiten mit Futtermitteln auf, daß bereits beim Auftropfen eines Extraktes auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Ethoxyquin geschlossen werden kann, da dieses Antioxydans eine gewisse Eigenfarbe besitzt. Eine ins Bräunliche gehende kardinalrote Farbe des Extraktes deutet nach eigenen Erfahrungen das Vorliegen von Ethoxyquin an.

Da es nicht möglich war, mit den gebräuchlichsten Laufmitteln wie Chloroform-Methanol (97:3), Aceton-Chloroform (1:9) und Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5) Ethoxyquin und Aflatoxin B_1 auf der DC-Platte scharf abzutrennen, kamen noch andere Fließmittel zur

Anwendung. Abbildung 9 gibt die damit gewonnenen Resultate wieder.

Abb. 9: Verhalten der Ethoxyquinfluoreszenz bei Verwendung zusätzlicher Fließmittel

	Fließmittel			Joddämpfe
	1.	2.	3.	
Lauf-front	_____	_____	_____	Die Fluoreszenzen von Aflatoxin B ₁ + G ₁ (A, B ₁ ; A, G ₁) und Ethoxyquin (E) verschwinden nicht
Startlinie				
Rf-Wert:	A, B, 0.23 A, G, 0.30 0.36	A, B, 0.29 A, G, 0.13	0.62 { 0.58 0.65	

Fließmittel: Chloroform-Aceton (180:2) = 1.
 Toluol-Äthylacetat-90 %ige Ameisensäure (5:4:1) = 2.
 Chloroform-Aceton-Wasser (88:12:1,5) = 3.

Am ungeeigneten erwies sich das Fließmittel Chloroform-Aceton-Wasser. Ethoxyquin trennt sich dabei in zwei Fluoreszenzflecken auf und zwar in unmittelbarer Nähe der B₁-Fluoreszenz. Chloroform-Aceton (180:2) entwickelte das Antioxydans ähnlich wie das Fließmittel Diäthyläther-Aceton-Chloroform; also ungefähr einen Zentimeter über der B₁-Fluoreszenz erscheint Ethoxyquin, aber auch hier wieder unterteilt.

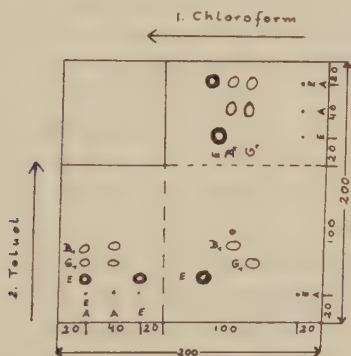
Durch die Anwendung von Joddämpfen gelang es nicht, eine klare Differenzierung zwischen Ethoxyquin und Aflatoxin B₁ zu erreichen.

Ein außerordentlich gutes und diagnostisch verwertbares Ergebnis wurde dagegen mit Toluol-Äthylacetat-90 %iger Ameisensäure erzielt. Ethoxyquin wird bei Verwendung dieses Fließmittels als ein fluoreszierender Fleck, etwa einen Zentimeter von der Startlinie entfernt, festgehalten und stört somit im Dünnschichtchromatogramm die Beurteilung der Aflatoxine nicht.

Mit dem modifizierten SEIER-Verfahren ließ sich ebenfalls eine gute Abtrennung der Ethoxyquinfluoreszenz von der des Aflatoxin B_1 erreichen (s.u.), jedoch ist die zweidimensionale Methode durch das vollauf befriedigende Ergebnis mit dem Toluol-Äthylacetat-Ameisensäure-Gemisch nunmehr überflüssig geworden.

Ein weiteres positives Resultat wurde noch erzielt unter der Voraussetzung, daß Aflatoxinstandard als interner Standard auf die Ethoxyquinprobe aufgetropft wurde. Bemerkenswerterweise trennte sich in diesem Fall sogar bei Verwendung des Laufmittels Chloroform-Methanol, also jenem Fließmittel, welches zuvor weniger günstige Ergebnisse geliefert hatte, die Ethoxyquinfluoreszenz deutlich von dem B_1 -Fleck ab, nämlich etwa einen halben Zentimeter oberhalb Aflatoxin B_1 . Auf diese Weise ist es möglich, auch mit den in anderer Weise bewährten Fließmitteln Ethoxyquin deutlicher zur Darstellung zu bringen.

Abb. 10: Ergebnis der zweidimensionalen Auftrennung von Ethoxyquin und Aflatoxin B_1+G_1 -Standard



Zahlenangaben in mm

E = Ethoxyquin

A = Aflatoxin B_1+G_1

Bei der Routineuntersuchung von Futtermitteln, insbesondere Geflügelfutter, auf Aflatoxine wurde schließlich noch festgestellt, daß das andere Antioxydans BIT (Butylhydroxy(oxy)toluol) sich wie Ethoxyquin im Dünnschichtchromatogramm auftrennt.

3.3.2 Testung der Cytotoxizität des Ethoxyquin mit biologischen Mykotoxinnachweisverfahren

Zur Klärung der Frage, ob Ethoxyquin auf Grund zelltoxischer Eigenschaften eventuell auch das Ergebnis biologischer Mykotoxinnachweisverfahren nachteilig zu beeinflussen vermag, wurde das Antioxydans vor allem gegenüber den biologischen Testobjekten geprüft, die zur Absicherung eines Aflatoxin B_1 -DC-Nachweises wegen besonders hoher Empfindlichkeit vornehmlich Verwendung finden (GEDEK, B., 1972).

3.3.2.1. Hühnerembryotest

3.3.2.1.1 Durchführung des Verfahrens

Es wurden sowohl aus den handelsüblichen Präparaten hergestellte Ethoxyquinlösungen als auch ethoxyquinhaltige Extrakte aus Futtermitteln im Hühnerembryotest nach VERRETT et al. (1964) geprüft.

Die Gebrauchslösungen enthielten

- I : 25 mg 70 %ige Santoquin^R-Vormischung, gelöst in 0,2 ml Propylenglykol (PG) + 4,8 ml Rinder-Amnionflüssigkeit (RAF),
- II : 5 mg 70 %ige Santoquin^R-Vormischung, gelöst in 0,2 ml PG + 4,8 ml RAF,
- III: 2,5 mg 70 %ige Santoquin^R-Vormischung, gelöst in 0,1 ml PG + 4,9 ml RAF und
- IV : 1,25 mg Santoquin^R-Vormischung, gelöst in 0,05 ml PG + ad 5 ml RAF.

Zur Gewinnung von Lösungen aus Futtermitteln wurden viermal 50 g ethoxyquinhaltiges Kükenalleinmehl nach der PONS et al.-Methode (1966 a) extrahiert und jeder Extrakt, in 0,5 ml Chloroform gelöst, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Auf jeweils zehn DC-Platten wurde hierzu der Extrakt strichförmig in Mengen von 50 µl aufgetragen und die Entwicklung der Platten im Fließmittel Chloroform-Methanol (97:3) im Vergleich zu 10 µl Aflatoxin B_1 + G_1 -Standard vorgenommen. Die blauviolette Fluoreszenz in Nähe des B_1 -Standards wurde dann abgekratzt und das Kieselgel in einem Rundkolben gesammelt, wobei mit 50 ml Chloroform nachgespült wurde, und dann diese Chloroformlösung im Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Nach dem vollständigen Abdampfen des Chloroforms wurde das auf diese Weise gewonnene Eluat in 0,2 ml PG + 4,8 ml RAF überführt und

für den Test verwendet.

Für die erste Testreihe wurde die Lösung nicht verdünnt. Für die zweite Testreihe wurde zu 2 ml der Lösung nochmals RAF gegeben und zwar 2 ml, so daß eine Verdünnung der Ausgangslösung erhalten wurde. Eine Kontrolllösung wurde aus 0,2 ml PG + 4,8 ml RAF hergestellt.

Die Durchführung des Hühnerembryotestes erfolgte in allen Einzelheiten nach der von BEHRINGER (1972) bereits beschriebenen Methodik. Die Anwendung der gleichen Technik, bei welcher die zu testende Lösung jeweils in einer Menge von 0,1 ml in die Luftkammer befruchteter Eier der Rasse Weißes Leghorn der Linien M x K und K x K vor der Bebrütung geimpft wird, empfiehlt GEDEK, B. (1972) auch für die Absicherung eines DC-Nachweises mykotoxinverdächtigter Stoffe.

Die absolute, pro Ei verimpfte Ethoxyquinkonzentration betrug 350 µg, 70 µg, 35 µg respektive 17,5 µg. Die Auswertung der einzelnen Testreihen erfolgte unter Bezugnahme auf die Absterberate in der Kontrolle.

3.3.2.2 Resultate und deren Interpretation

Auf diese Weise wurde festgestellt, daß Ethoxyquin in Konzentrationen von 350 µg, 70 µg, 35 µg und 17,5 µg/Ei gegenüber Hühnerembryonen keine Toxizität entfaltet. In der Absterberate während einer Bebrütungsdauer von 20 Tagen war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Auch die aus dem Kükenalleinfutter gewonnenen Ethoxyquineluate erwiesen sich nicht für Hühnerembryonen als toxisch. Zwergwuchs, sowie Veränderungen an den Embryonen (Mißbildungen, Haemorrhagien, verfärbte Leber etc.) traten unabhängig von der verabreichten Ethoxyquinkonzentrationen auf und waren auch bei der Kontrolle nachweisbar. Derartige Erscheinungen erheben keinen Anspruch, als typisch für die Toxizität eines Stoffes gewertet zu werden, da sie allein schon durch die Bedingungen der Kunstbrut bei Hühnerembryonen auftreten können (ARNOLD und GREUEL, 1972). Damit bestätigten sich Untersuchungsergebnisse von WEBER (1967 a, b und 1972), welcher bei Versuchen mit fünf Tage alten Hühner- und Entenküken feststellte, daß Ethoxyquin in den handelsüblichen Konzentrationen für Makroorganismen nicht toxisch ist.

3.3.2.2 Zellkulturtest

3.3.2.2.1 Material und Methodik

Für die Prüfung des Ethoxyquin im Zellkulturtest wurden 5 mg der 70 %igen Santoquin^R-Vormischung in 0,2 ml DMF + 19,8 ml Zellkultur-erhaltungsmedium gelöst und davon ausgehend im Verhältnis 1:1 entsprechend einer geometrischen Reihe Verdünnungen bis zu Stufe VI hergestellt. Die als Kontrollen mitgeprüften Lösungen enthielten 0,1 ml DMF + 9,9 ml Medium (K_1), respektive 10,0 ml Erhaltungsmedium (K_2).

Herstellung und Beimpfung von Kälbernierenzellkulturen erfolgte nach der von GEDEK, B. (1972) gegebenen Anleitung für die Prüfung der LC_{50} von Mykotoxinen mit Hilfe des Zellkulturtestes. Anstelle von Primärkulturen wurden jedoch hierbei Sekundärkulturen der Virologischen Abteilung des Institutes für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München verwendet.

Beurteilt wurde der Test nach dem Auftreten von Lysis nach 24 und 48 Stunden Bebrütung bei 37°C.

3.3.2.2.2 Resultate und deren Interpretation

Die bei diesem Test erhaltenen Ergebnisse wurden in einer Tabelle (Tab. 18) zusammengefaßt. Danach wirkten Mengen von 10,9 µg Ethoxyquin noch nicht cytopathogen. Aber bereits die doppelte Konzentration erwies sich als zelltoxisch, wenn auch noch in einem sehr geringen Maße im Vergleich zu den Ethoxyquinmengen von 175 und 350 µg pro Zellkulturröhrchen. Eine Menge von ~ 10 µg kann danach als Dosis tolerata angesehen werden.

Wenn man davon ausgeht, daß einem Kilogramm Futter im allgemeinen nicht mehr als 150 mg Ethoxyquin zugemischt werden, verträgt die Zellkultur ~ 30mal höhere Ethoxyquinmengen, als ein Futtermittel als Zusatz enthält. Da nach Zusatz einer Menge von 150 mg/kg Futter maximal beim Zellkulturtest nur 0,3 µg/ml Medium auftreten können, dürfte der Test bei einer Verwechslung von Ethoxyquin mit Aflatoxin B_1 in jedem Fall ein negatives Resultat liefern.

Tabelle 18: Cytotoxizität einer 70 %igen Ethoxyquin-Vormischung gegenüber Kälbernierenkulturen

Verdünnungs- stufe	Ethoxyquin-Menge pro 2 ml Medium	Zellkultur nach	
		24 Stunden	48 Stunden
I	350 µg	100 % Lysis	100 % Lysis
II	175 µg	Schrumpfung Schollenbil- dung	5-20 % Lysis
III	87,5 µg	Schollenbil- dung	Schrumpfung
IV	43,7 µg	o.B.	1-3 % Lysis
V	21,8 µg	o.B.	1 % Lysis
VI	10,9 µg	o.B.	o.B.
Kontrolle 1		o.B.	o.B.
Kontrolle 2		o.B.	o.B.

3.3.3 Untersuchung der antibiotischen Aktivität des Ethoxyquin im Agar-Lochtest

3.3.3.1 Anwendung des Verfahrens

Die Agarplatten wurden in gleicher Weise, wie bereits beschrieben (s.S. 77), für den Test vorbereitet.

Hinsichtlich der antibiotischen Aktivität wurde die 70 %ige Santoquin^R-Vormischung in folgenden Konzentrationen geprüft:

1. 3 mg in 1 ml Chloroform;
2. 3 mg in 5 ml Chloroform und
3. 3 mg in 0,1 ml DMF + 0,1 ml RAF gelöst.

Außerdem fand das zweite handelsübliche Präparat in Flüssigform, die Emulsion, Verwendung:

1. unverdünnt und
2. 1 ml Ethoxyquin-flüssig in 10 ml Chloroform verdünnt.

Ferner wurden getestet Extrakte aus Maisgries + 2 mg 70 %iger Ethoxyquin-Vormischung, Weizen + 4 mg 70 %iger Ethoxyquin-Vormischung,

sowie Maisgries + 2 mg 70 %iger Ethoxyquin-Vormischung + 0,2 ml Aflatoxin B_1+G_1 -Standardlösung, aufgenommen in je 0,1 ml DMF + 0,1 ml RAF.

Als Kontrollen wurden mitgeprüft

1. reines Chloroform,
2. 0,1 ml DMF + 0,1 ml RAF,
3. Extrakte aus Maisgries und Weizen (gemahlen) ohne Antioxydanz- bzw. Aflatoxin B_1+G_1 -Zusatz, in 0,1 ml DMF + 0,1 ml RAF aufgenommen.

Die davon in die Stanzlöcher pipettierte Menge betrug einheitlich jeweils 0,2 ml.

3.3.3.2 Ergebnis und Besprechung

Die Ergebnisse dieser Testung gehen aus Tabelle 19 hervor.

Danach besitzt Ethoxyquin antibiotische Aktivität. Bereits kleinere Konzentrationen als 2100 μ g der 70 %igen Vormischung hemmten das Wachstum von *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*. Ethoxyquin-flüssig, bei welchem die Konzentration unbekannt ist, beeinflusste das *Bacillus*-Wachstum z.T. noch stärker.

Es handelte sich bei den antibiotisch aktiven Mengen des Ethoxyquin teilweise um wesentlich geringere Mengen, als Futtermitteln zugesetzt werden und im Futtermittlextrakt erscheinen. Bei einem Zusatz von 150 mg Ethoxyquin pro Kilogramm Futter ist im Extrakt einer 50 g Probe von diesem Antioxydanz eine Menge von 7,5 mg zu erwarten, vorausgesetzt, es erfolgt eine 100 %ige Herauslösung dieses Stoffes bei der Extraktion. Extrakte aus Handelsfuttermitteln mit einem Zusatz von Ethoxyquin müßten sich dann regelmäßig durch außerordentlich hohe antibiotische Aktivität auszeichnen.

Dies bestätigte sich jedoch nicht nach den Prüfungsergebnissen von mit Ethoxyquin versetzten Weizen und Maisgries. Es wären danach größere Hemmhöfe zu erwarten gewesen als mit 3 mg Santoquin^R-Vormischung. Das Umgekehrte trat ein (s. Tab. 19). Außerdem ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede in Abhängigkeit von der Zumischung von 2 und 4 mg pro 50 g Futtermittelrohstoff. Vermutlich wird bei der Extraktionsprozedur doch ein Teil des Antioxydanz entfernt und erscheint nicht mehr nach der Reinigung über die Chromatographiesäule im Extrakt.

Als interessantes Phänomen zeichnete sich eine stärkere Hemmwirkung nach Zusatz von Aflatoxin $B_1 + G_1$ zum Futtermittelrohstoff ab.

Es bestätigt sich damit die Feststellung, daß sehr ungleiche Stoffe im Test mit Mikroorganismen anzeigen und eine Beurteilung erschweren können. Trotzdem kann ein derartiger Test Hinweise erteilen, wenn es darum geht, noch nicht näher charakterisierte antibiotisch wirksame Stoffe zu erfassen, worauf im anschließenden Kapitel noch näher eingegangen werden soll.

Tabelle 19: Ergebnisse der Prüfung der antibiotischen Aktivität von Ethoxyquin im Agar-Lochtest.

Präparationen	Testlösung	Hemmhof-Ø in mm		
		K ₁	K ₂	K ₃
70 %ige Vormischung				
Ethoxyquingehalt:				
2100 µg	20		20	
420 µg	20; Einzelkolonien im Hof	-		
84 µg	18	-		
Ethoxyquin-flüssig				
unverdünnt	30	-		
1:10 verdünnt	26	-		
Maisgries +				
2 mg 70 %ige Ethoxyquin-Vormischung	22		-	21; Einzelkolonien im Hof
Weizen +				
4 mg 70 %ige Ethoxyquin-Vormischung	23		-	24; Einzelkolonien im Hof
Maisgries +				
2 mg 70 %ige Ethoxyquin-Vormischung +				
0,2 ml Aflatoxin B ₁ +G ₁				
-Standardlösung	27		18	

3.4 Experimente zur Charakterisierung eines noch nicht näher definierten Aflatoxin B_1 -vortäuschenden mikrobiellen Stoffwechselproduktes

3.4.1 Nachweis der Bildung des Stoffes durch bestimmte Schimmelpilze

Bei der Prüfung von Extrakten, die aus verpilzten Futtermitteln hergestellt worden waren, auf antibiotische Aktivität war aufgefallen, daß verstärkte Effekte zu erreichen waren, wenn im Dünnschichtchromatogramm im Bereich des Aflatoxin B_1 eine zusätzliche blauviolette Fluoreszenz auftrat. Es wurde vermutet, daß es sich hierbei nicht um einen Pflanzeninhaltsstoff oder um ein dem Futter zugesetztes Additiv handelte. Es hätte dann mit größerer Regelmäßigkeit in den Proben in Erscheinung treten müssen. Es wurde vielmehr angenommen, daß ein Stoffwechselprodukt verderbniserregender Schimmelpilze vorlag, welches möglicherweise nicht nur gegenüber Mikroorganismen, sondern auch im Makroorganismus von Säugern und Vögeln eine toxische Wirkung entfaltet. Durch verschiedene Experimente sollte die Richtigkeit dieser Annahme überprüft und als erstes festgestellt werden, ob die blauviolette Fluoreszenz von einem Stoffwechselprodukt sich im Futtermittel anreichernder Schimmelpilze herrührt.

3.4.1.1 Material und Methodik

Diese Frage sollte durch gezielte Verschimmelung mikrobiell einwandfreier Futtermischungen geklärt werden, wozu Stämme von *Aspergillen* ausgewählt wurden, die aus beanstandetem Futter isoliert worden waren. Es handelt sich dabei im einzelnen um einen aus Hafercreme isolierten *Aspergillus flavus*, Stamm 766/71 und dem *A. flavus*, Stamm DORN, welcher sich bei früheren Experimenten im Tierversuch als antibiotisch aktiv erwiesen hatte, der aber keine Aflatoxine bildete. Ferner wurde ein Stamm der *A. candidus*-Gruppe Nr. 726/71 eingesetzt, da *Aspergillen* dieser Gruppe besonders häufig hierzulande in verpilzten Futtermitteln anzutreffen sind, wobei meist nur Aflatoxin B_1 -vortäuschende Substanzen nachweisbar waren, aber kein Aflatoxin B_1 und G_1 . Das steht vermutlich damit

im Zusammenhang, daß diese Aspergillen keine Aflatoxine, aber im Dünnschichtchromatogramm sich ähnlich verhaltende Stoffwechselprodukte bilden. Ein *A. parasiticus*-Stamm (CBS 127.62), welcher sich als Aflatoxinbildner erwies, wurde vergleichend mitgeprüft.

Zwei Getreidearten, Mais und Weizen, die bei der Mehrzahl der Mischfutter einen wesentlichen Anteil stellen, wurden als Grundsubstrate gewählt. Es kam zusätzlich noch Hafercreme, aus welcher der Stamm *A. flavus* 766/71 isoliert werden konnte, und Geflügelfutter zur Verwendung. Letzteres wurde deshalb noch zu den Experimenten herangezogen, weil besonders Extrakte aus Fertigfutter für Geflügel die bislang nicht näher zu charakterisierende Fluoreszenz aufgewiesen hatte. Bei dem Fertigfutter für Geflügel handelt es sich um Alleinmehl für Küken (All-Mash K, Mischfutter nach DLG-Standard) des Feldmochinger Kraftfutterwerk Dr. ZENTZ & Co Nachf. mit folgender Zusammensetzung:

31,000 % Mais	2,000 % Malzkeime, getr. u. zerk.
30,000 % Weizen	2,000 % Mineralstoffmischung f.
19,000 % Sojaschrot, extr.	Gefl.
4,000 % Luzernegrasgrünmehl	1,000 % Futterfett
3,500 % Fischmehl	1,000 % Melasse
3,175 % Weizenbollmehl	0,300 % Vitaminvormischung f. Gefl.
3,000 % Maiskleberfutter	0,025 % Antibiotikavormischung--
	Chlortetracyclin Reg.-Nr.
	FM 99/69

100,000 % (10 mg/kg Mischfutter)

mit Ethoxyquin und Coccidiostaticum (Zoalene 80 mg/kg Fertigfutter)

Zwei Wege wurden bei der gezielten Anreicherung im Falle der Verwendung von Maisgries und Weizen eingeschlagen: Beide Futtermittelrohstoffe wurden mit und ohne vorherige Ansäuerung mit Milchsäure der Verschimmelung ausgesetzt.

Im ersteren Falle wurden zu 50 g Maisgries respektive Weizenkörner (gemahlen), abgefüllt in mit Zellstoffstopfen versehene Erlenmeyerkolben (Fassungsvermögen 250 ml), 50 ml physiologische NaCl-Lösung und 25 ml milchsaures Kartoffelsubstrat, hergestellt nach dem Rezept von GEDEK, B. (1968), gegeben. Nach dem Autoklavieren, 30 Minuten bei 121°C und 1,25 atü, wurde der Kolbeninhalt jeweils mit 3 ml Konidiensuspension beimpft, welche durch Abschwemmung von Schrägagarkulturen mit 5 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung gewonnen worden waren, und zehn Tage bei 32°C bebrütet.

Im zweiten Falle wurde nach der Methode von MEISER (1968) verfahren und jeweils zu 50 g Futter 25 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben. Nach dem Autoklavieren erfolgte die Beimpfung des Kolbeninhalts mit jeweils 3 ml Konidiensuspension, die zu diesem Zweck durch Abschwemmen einer Agarplattenkultur mit 30 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt worden war. Die im Anschluß daran vorgenommene Bebrütung erstreckte sich wiederum über zehn Tage bei 37°C.

Da bei Anwendung der ersteren Methode das Schimmelpilzwachstum üppiger war, wurde bei der Verschimmelung von Hafercreme und Geflügelfutter nur noch danach verfahren. Zur Herstellung des Feuchtigkeitsgehaltes wurde statt 50 ml eine Menge von 75 ml physiologischer Kochsalzlösung pro Kolben zugesetzt. Nach zehntägiger Bebrütungszeit wurden die verpilzten Ansätze, sowie jeweils eine unverschimmelte Probe der einzelnen Futtermittel (zur Kontrolle) nach der Methode von PONS et al. (1966 a) extrahiert und die daraus gewonnenen Extrakte in den Fließmitteln Chloroform-Methanol (97:3), Aceton-Chloroform (1:9), sowie Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5) entwickelt, wozu sie in Mengen von 50 µl strichförmig auf DC-Platten aufgetragen wurden. 10 µl des Aflatoxin B₁+G₁-Standard, aufgetropft, wurde zum Vergleich auf den DC-Platten mitgeführt.

3.4.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Über die im Dünnschichtchromatogramm von den mit verschiedenen Aspergillen angereicherten Futterproben im einzelnen erhaltenen Resultate geben die Tabellen 20-23 Auskunft.

Die Auftrennung der zur Kontrolle der auf die Aspergillen zurückzuführenden Effekte untersuchten Extrakte unverschimmelter Proben ergab keine Fluoreszenzen oder nur unterschiedliche zu vernachlässigende Flecken mit Ausnahme von Kükenalleinmehl.

Letzteres wies bei Verwendung von Chloroform-Methanol als Fließmittel die für Ethoxyquin typische blauviolette Fluoreszenz in Höhe des Aflatoxin B₁-Rf-Wertes auf. Sie trat auch deutlich nach Anreicherung mit den Schimmelpilzen hervor.

Bei Verschimmelung der Proben mit *A. parasiticus* war jeweils eine besonders intensive blaue Fluoreszenz festzustellen, die wegen

einheitlicher Rf-Werte und auf Grund der Übereinstimmung mit dem Aflatoxinstandard sich eindeutig wie Aflatoxin B_1 verhielt.

Die Extrakte der mit *A. candidus*, Stamm 726/71 angereicherten Proben trennten sich dagegen mit sehr unterschiedlichen Fluoreszenzspektren auf, wobei die grünlichen Farbtöne dominierten. Nur bei der Auftrennung der mit diesem Stamm verschimmelten Weizenprobe ließen sich ins Blaue gehende Fluoreszenzen erkennen. Da sie nur schwach und in Mischung mit anderen Farbtönen in Erscheinung traten, konnten sie auf der Suche nach der klaren blauvioletten Fluoreszenz außer acht gelassen werden.

Sehr wechselhafte Ergebnisse wurden mit *A. flavus*, Stamm 766/71 erzielt. Die damit verschimmelten Weizen- und Hafercremeproben zeigten nach Auftrennung der daraus gewonnenen Extrakte sehr schwache Fluoreszenzen in den Farbtönen grau, grünlich, rostrot und bläulich mit von Aflatoxin B_1 -abweichenden Rf-Werten. Der Maisgriesextrakt wies eine bläuliche Komponente mit einem höheren Rf-Wert als der Aflatoxin B_1 -Standard auf, und der Geflügelfutterextrakt zeigte eine zusätzliche hellblaue Fluoreszenz nur nach Verwendung von Chloroform-Methanol als Fließmittel unterhalb des Aflatoxin B_1 .

Lediglich nach Auftrennung der Extrakte der mit *A. flavus*, Stamm DORN verschimmelten Proben konnte die gesuchte blauviolette Fluoreszenz ermittelt werden. Sie ließ sich ausschließlich in der Geflügelfutteranreicherung nachweisen. In Extrakten von Maisgries, Weizenmehl und Hafercreme ließ sie sich als solche nicht wahrnehmen.

Als nachteilig erwies sich bei der Auswertung des Geflügelfutterextraktes das Ethoxyquin, weil es sich mit den verwendeten Fließmitteln auf der DC-Platte ebenfalls in Aflatoxin B_1 -Nähe auftrennte. Beide Fluoreszenzen, blauviolett, erschienen als ineinander übergehende Bänder. Es ergab sich hiermit im Rahmen dieser Arbeit zum zweiten Mal die Problematik, ein Verfahren herauszufinden, mit welchem eine klare Abtrennung sich verschiedentlich im Dünnschichtchromatogramm überschneidender Substanzen zu erzielen ist. Auch dann wird es erst möglich sein, die Natur der außer Ethoxyquin gelegentlich im Aflatoxin B_1 -Bereich auftretenden blauvioletten Fluoreszenzen zu erforschen.

Da es einerseits gelang nachzuweisen, daß der Stoff bei der Ver-

mehrerung eines *Aspergillus flavus*-Stammes in einem Futtermittel entstehen kann, und andererseits bislang nur beanstandete Futtermischungen mit einem im Vergleich zur Norm überhöhten Schimmelpilzgehalt diese Fluoreszenz im Dünnschichtchromatogramm aufwiesen, dürfte die Annahme berechtigt sein, daß es sich dabei um ein mikrobielles Stoffwechselprodukt handelt.

Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter verfolgt und deshalb als nächstes versucht, mit anderen Fließmitteln eine Abtrennung dieses Produktes des mikrobiellen Stoffwechsles zu erreichen.

Tabelle 20 : Dünnschichtchromatogramm der Maisgriesextrakte nach gezielter Verschimmelung des Rohstoffes mit verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen

Mit verschiedenen Fließmitteln erzielte Rf-Werte von Aflatoxin B₁-Standard und anderer, im Extrakt vorkommender, Stoffe unter Angabe von Farbe und Durchmesser (in cm) der Fluoreszenzen

Pilzstamm	Rf-Wert u. in () Ø der Fluoreszenz Aflatoxin B ₁ -Stand.	Rf-Werte u. in () Ø der Fluoreszenzen anderer Stoffe	Farbtöne der Fluoreszenzen anderer Stoffe
-----------	--	---	---

Fließmittel: Chloroform - Methanol (97:3)

A. flavus, St. DORN	0.35 (0,7)	an Lauffront	hell grau (-)
A. flavus, St. 766/71	0.35 (0,7)	0.53 (0,8)	hell grau b u. gelblich
A. candidus St. 726/71	0.36 (0,6)	0.27 (1,4) 0.48 (0,7) 0.67 (1,2)	grünlich grünlich grünlich
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.39 (0,6)	0.41 (0,8) 0.62 (0,6)	b wie Stand. gelbgrau

Fließmittel: Aceton - Chloroform (1:9)

A. flavus, St. DORN	nicht weiter verfolgt		
A. flavus, St. 766/71	0.23 (0,7)	0.55 (0,4)	hell grau-bv
A. candidus, St. 726/71	nicht weiter verfolgt		
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.26 (0,5)	0.28 (0,6) 0.35 (0,7) 0.56 (0,7)	b wie Stand. b (-) Überlagerung: bräunlich-w.

Fließmittel: Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5)

A. flavus, St. DORN	nicht weiter verfolgt		
A. flavus, St. 766/71	0.19 (0,6)	0.56 (0,9)	hell bv
A. candidus, St. 726/71	nicht weiter verfolgt		
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.20 (0,5)	0.20 (0,6) 0.33 (0,7) 0.53 (0,7)	b wie Stand. lila b Überlagerung: gelblich-b-w

Tabelle 21: Dünnschichtchromatogramm der Weizenextrakte nach gezielter Verschimmelung des Rohstoffes mit verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen

Mit verschiedenen Fließmitteln erzielte Rf-Werte von Aflatoxin B₁-Standard und anderer, im Extrakt vorkommender, Stoffe unter Angabe von Farbe und Durchmesser (in cm) der Fluoreszenzen

Pilzstamm	Rf-Wert u. in () Ø der Fluoreszenz Aflatoxin B ₁ -Stand.	Rf-Werte u. in () Ø der Fluoreszenzen anderer Stoffe	Farbtöne der Fluoreszenzen anderer Stoffe
-----------	--	---	---

Fließmittel: Chloroform - Methanol (97:3)

A. flavus, St. DORN	0.51 (1,0)	0.16 (1,0) 0.74 (1,3)	grau (-) grau
A. flavus, St. 766/71	0.46 (0,9)	0.07 (0,7) 0.16 (0,6) 0.66 (0,9)	graugrün (-) bläulich grau
A. candidus, St. 726/71	0.45 (0,8)	0.25 (1,0) 0.34 (0,5) 0.44 (0,7) 0.63 (1,0)	grünlich bv (-) grünl.-b. grau grau
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.35 (0,7)	0.35 (0,9)	b wie Stand.

Fließmittel: Aceton - Chloroform (1:9)

A. flavus, St. DORN	nicht weiter verfolgt		
A. flavus, St. 766/71	nicht weiter verfolgt		
A. candidus, St. 726/71	0.22 (0,6)	0.05 (0,3) 0.10 (0,5) 0.23 (0,4) 0.28 (0,5) 0.35 (0,5) 0.45 (0,7) 0.55 (0,8)	gelbgrün (-) gelbgrün (-) gelbgrün (-) gelbgrün (-) u. lila b lila gelblich-b gelblich-b
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.25 (0,6)	0.22 (0,6) 0.29 (0,7) 0.45 (0,8) 0.60 (1,0)	grau-b (-) b wie Stand. rostrot gelblich

Fortsetzung Tabelle 21:

Pilzstamm	Rf-Wert u. in () Ø der Fluoreszenz Aflatoxin B ₁ -Stand.	Rf-Werte u. in () Ø der Fluoreszenzen anderer Stoffe	Farbtöne der Fluores- zenzen anderer Stoffe
<u>Fließmittel: Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5)</u>			
A. flavus, St. DORN	nicht weiter verfolgt		
A. flavus, St. 766/71	nicht weiter verfolgt		
A. candidus, St. 726/71	0.21 (0,7)	0.11 (0,2) 0.16 (0,4) 0.28 (0,5) 0.38 (1,1) 0.49 (0,9)	gelbgrün gelbgrün gelbgrün (-) bv (-) gelbgrün (-)
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.20 (0,5)	0.21 (0,6) 0.33 (1,0) 0.46 (0,8) 0.58 (0,9)	b wie Stand. bv (-) rostrot (-) gelblich (-)

Tabelle 22: Dünnschichtchromatogramm der Hafercremeextrakte nach gezielter Verschimmelung des Rohstoffes mit verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen

Mit verschiedenen Fließmitteln erzielte Rf-Werte von Aflatoxin B₁-Standard und anderer, im Extrakt vorkommender, Stoffe unter Angabe von Farbe und Durchmesser (in cm) der Fluoreszenzen

Pilzstamm	Rf-Wert u. in () Ø der Fluoreszenz Aflatoxin B ₁ -Stand.	Rf-Werte u. in () Ø der Fluoreszenzen anderer Stoffe	Farbtöne der Fluoreszenzen anderer Stoffe
-----------	--	---	---

Fließmittel: Chloroform - Methanol (97:3)

A. flavus, St. DORN	0.38 (0,9)	0.10 (0,4) 0.28 (0,4) 0.59 (1,0)	sehr schwach fluoreszierend
A. flavus, St. 766/71	0.38 (0,9)	0.09 (0,6) 0.19 (0,8) 0.29 (0,8) 0.39 (0,7) 0.47 (0,6) 0.57 (0,8)	grünlich (-) grünlich (-) bläulich (-) grau (-) rostrot (-) bv (-)
A. candidus, St. 726/71	0.40 (0,7)	0.27 (0,5) 0.29 (0,5) 0.39 (0,8)	grünlich (-) hell b (-) Überlagerung: grünlich-b (-)
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.32 (0,8)	0.12 (0,7) 0.37 (1,7) 0.59 (0,7)	bv (-) Überlagerung: dunkelgrün u. b (+) lila-w

Fließmittel: Aceton - Chloroform (1:9)

A. flavus, St. DORN	0.24 (0,7)	sehr schwach fluoreszierend
A. flavus, St. 766/71	0.25 (0,8)	sehr schwach fluoreszierend
A. candidus, St. 726/71	0.21 (0,5)	0.13 (0,8) 0.28 (0,6) 0.41 (0,6) grünlich weißlich gelblich
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.24 (0,7)	0.04 (0,8) 0.27 (1,4) 0.61 (0,5) oliv Überlagerung: dunkelgrün u. b (+) lila-w

Fortsetzung Tabelle 22:

Pilzstamm	Rf-Wert u. in () Ø der Fluoreszenz Aflatoxin B ₁ -Stand.	Rf-Werte u. in () Ø der Fluoreszenzen anderer Stoffe	Farbtöne der Fluoreszenzen anderer Stoffe
<u>Fließmittel: Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5)</u>			
A. flavus, St. DORN	0.22 (0,5)	sehr schwach fluoreszierend	
A. flavus, St. 766/71	0.25 (0,7)	sehr schwach fluoreszierend	
A. candidus, St. 726/71	0.22 (0,5)	0.12 (0,4) 0.18 (0,4) 0.28 (0,5)	grünlich weißlich grünlich
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.23 (0,6)	0.13 (0,5) 0.23 (1,2) 0.36 (0,5) 0.59 (0,5)	dunkelgrün b (+) dunkelgrün lila-w

Tabelle 23: Dünnschichtchromatogramm der Kükenalleinmehlextrakte nach gezielter Verschimmelung des Futtermittels mit verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen

Mit verschiedenen Fließmitteln erzielte Rf-Werte von Aflatoxin B₁-Standard und anderer, im Extrakt vorkommender, Stoffe unter Angabe von Farbe und Durchmesser (in cm) der Fluoreszenzen

Pilzstamm	Rf-Wert u. in () Ø der Fluoreszenz Afltoxin B ₁ -Stand.	Rf-Werte u. in () Ø der Fluoreszenzen anderer Stoffe	Farbtöne der Fluoreszenzen anderer Stoffe
Fließmittel: Chloroform - Methanol (97:3)			
A. flavus, St. DORN	0.42 (0,7)	0.08 (0,5) 0.14 (0,5) 0.39 (1,5) 0.70 (0,9)	gelbgrün grünlich bv in 2 Bänder, je ca. 0,7 Ø lila-w
A. flavus, St. 766/71	0.48 (0,8)	0.14 (0,3) 0.18 (0,3) 0.37 (0,5) 0.47 (0,9)	bläulich (-) grünlich (-) hell b (-) bv (-)
A. candidus, St. 726/71	0.48 (0,8)	0.11 (0,4) 0.17 (0,4) 0.32 (0,5) 0.45 (0,9)	gelbgrün grünspanfarben gelbgrün b
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.50 (0,7)	0.09 (0,4) 0.18 (0,5) 0.43 (0,5) 0.51 (0,8)	gelbgrün (+) grünspanfarben bläulich b wie Stand.
Fließmittel: Aceton - Chloroform (1:9)			
A. flavus, St. DORN	0.23 (0,6)	Start 0.09 (0,5) 0.23 (1,1) 0.32 (0,5) 0.62 (0,9)	gelb grünspanfarben bv gelblich b-weißlich
A. flavus, St. 766/71	0.26 (0,7)	Start 0.09 (0,4) 0.25 (0,7)	ocker grünspanfarben bv
A. candidus, St. 726/71	0.24 (0,8)	Start 0.07 (0,3) 0.13 (0,6) 0.24 (0,7)	ocker grünspanfarben grünlich bv
A. parasiticus, St. CBS127.62	0.24 (0,6)	Start-0.12 0.23 (0,6) 0.30 (0,7) bis Front	gelbgrüne Bänder Überlagerungen: b (+) u. bv ockerfarbene Bänder

Fortsetzung Tabelle 23:

Pilzstamm	Rf-Wert u. in () Ø der Fluoreszenz Afaltotoxin B ₁ -Stand.	Rf-Werte u. in () Ø der Fluoreszenzen anderer Stoffe	Farbtöne der Fluoreszenzen anderer Stoffe
<u>Fließmittel: Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5)</u>			
A. flavus, St. DORN	0.23 (0,7)	Start	dunkel ocker
		0.05 (0,3)	gelb
		0.14 (0,5)	grünspanfarben
		0.32 (1,1)	bv
		0.47 (1,1)	ocker
		0.62 (0,8)	b-weißlich
A. flavus, St. 766/71	0.25 (0,6)	0.05 (0,3)	ocker-grünl.
		0.14 (0,4)	grünspanfarben
		0.30 (0,5)	bv
		0.36 (0,6)	grün (-)
		0.49 (0,8)	ocker (-)
A. candidus, St. 726/71	0.22 (0,7)	Start-0.18	grünl. Bänder
		0.26 (0,5)	bv
		0.29-Front	unterschiedlich gefärbte Bänder
A. parasiticus, St. CBS127.82	0.22 (0,5)	Start	gelb
		0.12 (0,4)	grün
		0.20 (0,4)	blau
		0.31 (0,6)	bv
		bis Front	gelb

Zeichenerklärung zu den Tabellen 20-23:

Stand. = Standard
b = blau
bv = blauviolett
w = weiß
(-) = schwach fluoreszierend
(+) = stark fluoreszierend

3.4.2 Versuche zur Erzielung einer dünnschichtchromatographisch von Aflatoxin B₁ zu trennenden Darstellung des Stoffes

Hierfür wurden abermals Extrakte aus mit *Aspergillus flavus*, Stamm DORN angereicherten Kükenalleinmehl gewonnen. Dabei wurden 50 g dieses Futters 75 ml physiologische Kochsalzlösung zugesetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten der bereits beschriebenen Methode (s.S. 103-104). Die Auftrennung der Extrakte wurde aber auf drei verschiedenen Wegen versucht.

3.4.2.1 Eindimensionale Auftrennung

3.4.2.1.1 Angewandte Technik

Der Extrakt wurde hierzu in 0,5 ml Chloroform aufgenommen und davon 50 µl strichförmig aufgetragen. Zum Vergleich wurde daneben jeweils 10 µl Aflatoxin B₁+G₁ und 10 µl Ethoxyquin-Lösung aufgetropft. Außer den Laufmitteln Chloroform-Methanol (97:3), Aceton-Chloroform (1:9), Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5) wurden noch die Gemische von Chloroform-Aceton in den Verhältnissen 182:4; 180:2 + 196:4 eingesetzt, wobei die letzteren beiden (nach BÜSENBERG, 1970 b) nacheinander zur Entwicklung ein und derselben Platte Verwendung fanden. Weitere erprobte Fließmittel stellten Benzol-Essigsäure-Äthylester-Essigsäure (5:4:1) und Toluol-Essigsäureäthylester-90 %ige Ameisensäure (5:4:1) dar. Außerdem wurde die Wirkung der Joddämpfe geprüft.

Verdünnungen der Extrakte wurden mit 3,0 ml, 5,0 ml und 10,0 ml Chloroform hergestellt und bei punktförmiger Auftragung davon jeweils 10 und 30 µl verwendet.

3.4.2.1.2 Resultate und deren Interpretation

Wie der Tabelle 24 und der ergänzenden Abbildung (Abb. 11) entnommen werden kann, lieferten die Fließmittel 1,2,3,5 und 6 bei der eindimensionalen Auftrennung keine befriedigenden Resultate, da sich die Rf-Werte von Aflatoxin B₁, Ethoxyquin und dem näher zu charakterisierenden mikrobiellen Stoffwechselprodukt zum Teil einander ähnelten, und weil die Fluoreszenzbänder der abzutrennenden Fluoreszenz und des Ethoxyquin teilweise sehr breit waren, so daß

sie sogar den Rf-Wert der Aflatoxin B₁-Standardlösung erreichten. Die Aceton-Gemische bewirkten außerdem teilweise eine zweigeteilte Aufspaltung der Ethoxyquinfluoreszenz. Bei der Anwendung von Aceton-Chloroform (180:2) als Laufmittel lag der Rf-Wert des mikrobiellen Stoffwechselproduktes zwischen Aflatoxin B₁ und Ethoxyquin. Benzol- und Toluol-Gemische (7 und 8) ziehen die fragliche Fluoreszenz in Höhe der Laufront, wodurch die beste Abtrennung der einzelnen Bänder gewährleistet war. Die Behandlung der entwickelten DC-Platte mit Joddämpfen bewirkte keine Auslöschung der Fluoreszenzen, weder der des Aflatoxin B₁ oder des Ethoxyquin, noch der des mikrobiellen Stoffwechselproduktes.

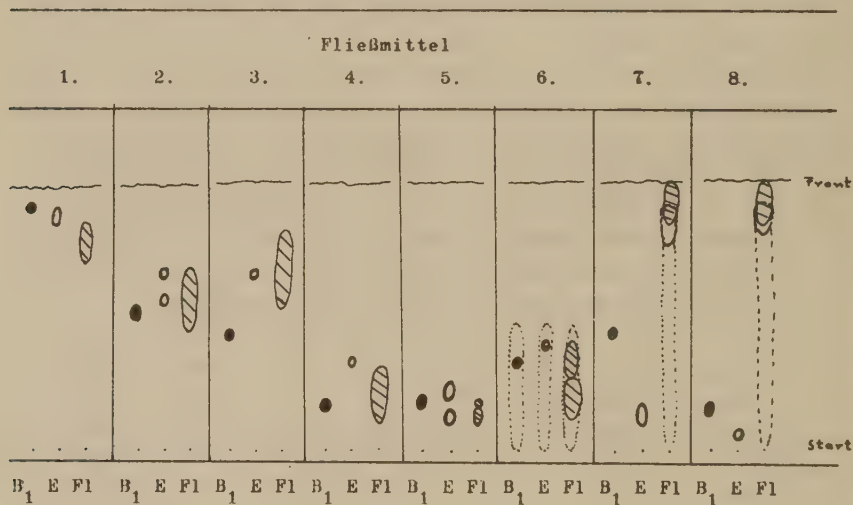
Tabelle 24: Ergebnisse der eindimensionalen Auftrennung der aus mit *A. flavus*, Stamm DORN verpilzten Kükenalleinmehl gewonnenen Extrakte bei Anwendung verschiedener Fließmittelsysteme

Fließmittel	Rf-Werte und in () ϕ der Fluoreszenzen in cm von Aflatoxin B ₁	Ethoxyquin	näher zu charakterisierendes mikrobielles Stoffwechselprodukt
1.	0.85 (0,6)	0.80 (0,6)	0.73 (1,8)
2.	0.49 (0,5)	0.52 (0,5) 0.59 (0,5)	0.53 (2,3)
3.	0.43 (0,7)	0.65 (0,7)	0.62 (2,3)
4.	0.17 (0,3)	0.32 (0,7)	0.21 (1,6)
5.	0.21 (0,8)	0.13 (0,5) 0.21 (0,7)	0.13 (0,5) 0.19 (0,5)
			zwischen den Bändern schwächere blauviolette Fluoreszenz
6.	Vom Startpunkt bis zu einem Rf-Wert von 0.40 blau fluoreszierend mit jeweils einer bes. intensiven Fluoreszenz bei folgenden Rf-Werten		
	0.30	0.37	0.23 (0,9) 0.33 (0,9)
7.	0.42 (0,6)	0.14 (0,8)	Front (1,5)
8.	0.16 (0,4)	0.05 (0,4)	Front (1,4)
mit Jod- dämpfen	nicht aus- löschbar	nicht aus- löschbar	nicht aus- löschbar

Zeichenerklärung zu Tabelle 24:

- Fließmittel: 1. = Chloroform-Methanol (97:1)
 2. = Aceton-Chloroform (1:9)
 3. = Diäthyläther-Aceton-Chloroform (4:1:5)
 4. = Chloroform-Aceton (180:2)
 5. = Chloroform-Aceton (182:4)
 6. = Chloroform-Aceton (180:2) zur Vorentwicklung
 Chloroform-Aceton (196:4) zur Hauptentwicklung
 7. = Benzol-Essigsäureäthylester-Essigsäure (5:4:1)
 8. = Toluol-Essigsäureäthylester-90 %ige Ameisensäure
 (5:4:1)

Abb. 11: Anordnung der Fluoreszenzen von Aflatoxin B₁, Ethoxyquin und des noch näher zu definierenden mikrobiellen Stoffwechselproduktes im Dünnschichtchromatogramm nach Anwendung von acht verschiedenen Fließmittelsystemen



- Zeichenerklärung: B₁ = Aflatoxin B₁-Standard
 E = Ethoxyquin-Standardlösung
 Fl = Fluoreszenz des noch näher zu definierenden mikrobiellen Stoffwechselproduktes
 Die einzelnen Fließmittel sind als Fußnote zu Tabelle 24 aufgeführt
 () = Nebenfluoreszenzen

3.4.2.2 Zweidimensionale Auftrennung

3.4.2.2.1 Angewandte Technik

Gemäß den hierzu von BÖSENBERG (1970 b) für den Nachweis der Aflatoxine gegebenen Empfehlungen wurde im ausgekleideten Tank die DC-Platte zunächst 11 cm hoch in einem Gemisch von Diäthyläther-Methanol-Wasser (94:4,5:1,5) entwickelt und dann dieselbe um 90° gedreht und erneut in einem unausgekleideten Tank mit Chloroform-Aceton (9:1) bis zu einer Laufhöhe von 10 cm entwickelt (Verfahren 1). Außerdem wurde die Methode mit der Vorreinigung in Diäthyläther (15 cm hoch) versucht und die DC-Platte zuerst in Chloroform-Methanol (97:3) 12 cm hoch entwickelt und nach Drehung derselben um 90° diese nacheinander den Fließmittel Chloroform-Aceton (9:1) und Chloroform-Aceton (98:2) ausgesetzt. Die Laufhöhe betrug hierbei 10 cm, und der Tank wurde dazu nicht ausgekleidet (Verfahren 2).

Bei dem einen wie bei dem anderen Verfahren wurden von den Standardlösungen Aflatoxin $B_1 + G_1$ und Ethoxyquin (hergestellt aus Granulat und Emulsion), sowie von dem Probeextrakt, aufgenommen in 1,0 ml Chloroform, jeweils 10 µl auf die DC-Platte punktförmig aufgetragen. Die Anordnung der aufgetragenen Lösungen (Standards und Probeextrakte) geht aus den in der Abbildung 12 eingetragenen Startpunkten hervor.

3.4.2.2.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Die zweidimensionale Auftrennung schaffte keine hundertprozentige Klarheit darüber, in welcher Höhe sich der noch nicht näher definierte Stoff darstellt. Da ein strichförmiges Auftragen bei dieser Technik nicht möglich ist, diese Art des Auftragens aber für ein anschließendes präparatives Arbeiten unerlässlich ist, wurden keine weiteren Versuche mit dieser relativ umständlichen und zeitaufwendigen Technik durchgeführt.

Höhere Verdünnungen des Futtermittelextraktes ergaben keine klarer abgetrennten Fluoreszenzbilder im Dünnschichtchromatogramm.

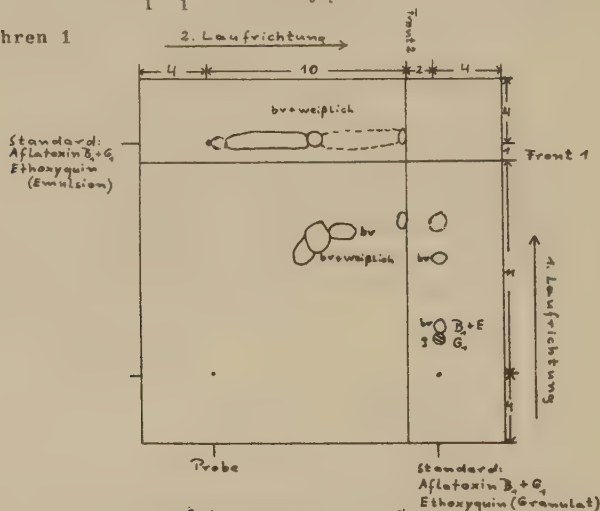
Bei der Verwendung des Ethoxyquin, hergestellt aus dem flüssigen Santoquin^R-Präparat, entwickelte der Stoff sehr langgestreckte Fluoreszenzflecke, welche sogar Aflatoxin G_1 überdeckten, so daß

Standardlösungen für die Dünnschichtchromatographie vom Ethoxyquin nur aus der 70 %igen Vormischung, dem Granulat, gewonnen werden sollten.

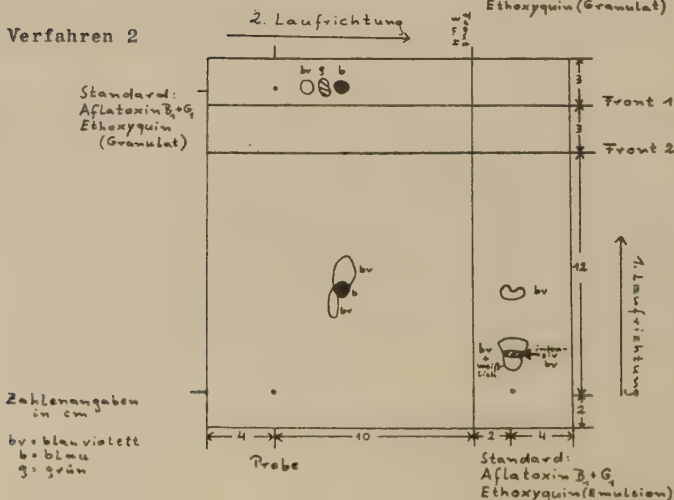
In der Intensität der Fluoreszenz entsprach der noch näher zu definierende Stoff 10 µl Aflatoxin B_1 -Standard unter der Voraussetzung, daß von dem Geflügelfutterextrakt, aufgenommen in 1 ml Chloroform, 30 µl auf eine DC-Platte punktförmig aufgetragen worden waren.

Abb. 12: Ergebnis der zweidimensionalen Auftrennung des aus mit *A. flavus*, Stamm DORN verpilzten Kikeneiweißmehls gewonnenen Extrakte im Vergleich zu Standardlösungen von Aflatoxin $B_1 + G_1$ und Ethoxyquin

a) Verfahren 1



b) Verfahren 2



Da eine vollständige Trennung des Stoffes im Dünnschichtchromatogramm trotz der Verwendung einer großen Zahl von Fließmitteln von Begleitstoffen des Extraktes nicht erzielt werden konnte, und weil auch die Bedampfung mit Jod in dieser Beziehung nicht weiterhalf (s. Tab. 24), mußte eine präparative Bearbeitung vorerst unterbleiben.

Es wurde durch die Anwendung biologischer Nachweisverfahren versucht zu klären, ob es sich bei dem Stoff um ein Mykotoxin handelt. Dabei dürften eventuelle Beimengungen des Ethoxyquin nicht stören, da es sich zumindest im Hühnerembryotest und Zellkulturtest (s.S. 97 und 98) in dem im Futter vorkommenden Konzentrationen als atoxisch erwiesen hatte.

3.4.3 Prüfung des Stoffes auf seine Zugehörigkeit zu den Mykotoxinen

3.4.3.1 Untersuchung von Eluaten im Hühnerembryotest

3.4.3.1.1 Durchführung des Verfahrens

Der Hühnerembryotest nach VERRETT et al. (1964) wurde zur Prüfung des Stoffes auf akute Toxizität wiederum in allen Einzelheiten nach der von BEHRINGER (1972) beschriebenen Methodik durchgeführt und ausgewertet.

Zur Gewinnung von Impfmengen des zu prüfenden Stoffes wurde aber nur mit *Aspergillus flavus*, Stamm DORN verpilztes Kükenalleinmehl nach der Methode von PONS et al. (1966 a) extrahiert und die Extrakte in dem am besten trennenden Fließmittel Toluol-Athylacetat-90 %ige Ameisensäure (5:4:1) entwickelt. Es wurden von den DC-Platten Eluate gewonnen und damit vier Gebrauchslösungen hergestellt. Es enthielten

Gebrauchslösung I : Eluate von zwei Extrakten, aufgenommen in
0,2 ml Propylenglykol + 4,8 ml Rinder-Amnion-
flüssigkeit,

Gebrauchslösung II : Eluat von einem Extrakt, gelöst in 0,1 ml PG
+ 3,9 ml RAF,

Gebrauchslösung III: Eluat von einem Extrakt, aufgenommen in 0,2 ml
PG + 4,8 ml RAF und im Verhältnis 1:1 mit RAF
verdünnt,

Gebrauchslösung IV: desgleichen, aber andere Charge.

Als Kontrolle für die verwendeten Lösungsmittel wurde jeweils 0,2 ml PG in 4,8 ml RAF mitgetestet.

Die Impfmenge pro Ei betrug wiederum 0,1 ml.

3.4.3.1.2 Resultate und deren Interpretation

Unabhängig davon, wie hoch konzentriert der fragliche Stoff ins Ei eingepflegt wurde, ergaben sich keine Unterschiede in den Absterberaten der Embryonen im Vergleich zur Kontrolle. Auch sonst waren keine Unregelmäßigkeiten festzustellen, die in Beziehung zu einer Toxizität des Stoffes stehen konnten. Eine akute Toxizität gegenüber sich teilenden Zellen war daraus nicht ablesbar.

3.4.3.2 Untersuchung von Eluaten auf Mäusetoxizität

Da von MINTZLAFF (1971) zur Prüfung akuter Toxizität von Mykotoxinen auch der Test mit Mäusen empfohlen wird, wurde dieser ebenfalls eingesetzt.

3.4.3.2.1 Applikationsformen

Das mikrobielle Stoffwechselprodukt wurde juvenilen Mäusen der Zuchtlinie MNRI mit einem Körpergewicht von 10-15 g, weiblichen und männlichen Geschlechts, in Gruppen von jeweils zehn Tieren oral oder intraperitoneal verabreicht.

Für die intraperitoneale Applikation wurden abermals Extrakte aus mit *Aspergillus flavus*, Stamm DORN verpilzten Kükenalleinmehl gewonnen (s.S. 102 ff.) und nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung mit den Eluaten verschieden konzentrierte Implösungen hergestellt. Sie enthielten

- a) Eluate zweier Extrakte, aufgenommen in 0,2 ml PG + 3,8 ml RAF,
- b) Eluat eines Extraktes, aufgenommen in 0,2 ml PG + 3,8 ml RAF,
- c) Eluat eines Extraktes, aufgenommen in 0,2 ml PG + 3,8 ml RAF und im Verhältnis 1:1 mit RAF verdünnt und
- d) Eluat eines Extraktes, aufgenommen in 0,2 ml PG + 3,8 ml RAF und im Verhältnis 1:2 mit RAF verdünnt.

Als Kontrolle diente eine Lösung aus 0,2 ml PG + 3,8 ml RAF.

Die davon pro Maus in die regio inguinalis applizierte Menge betrug 0,3 ml.

Die Mäuse wurden konventionell gehalten und sieben Tage lang beobachtet. Innerhalb dieses Zeitraumes sollten die Tiere verendet sein, um im Falle einer Wirkung von einer akuten Toxizität sprechen zu können (CHRISTENSEN et al., 1968; u.a.) Da alle Tiere den Versuch überlebten, wurden sie nach sieben Tagen Beobachtungszeit getötet und von jeweils drei Tieren Leber, Nieren und Milz in 1:7 verdünnter Formalinlösung für eine histologische Untersuchung konserviert.

Bei der oralen Applikation gelangten von dem gezielt mit *A. flavus*, Stamm DORN verschimmelten Kükenalleinmehl täglich jeweils 5 g pro Maus innerhalb von sieben Tagen zur Verfütterung. Parallel dazu wurde in einem zweiten Fütterungsversuch ein anderes pelletiertes Geflügelfutter verabreicht, in welchem der *A. flavus*-Stamm nach der Methode von MEISER (1968) angereichert worden war. Es sollte damit überprüft werden, ob der Stoff beim Wachstum des Pilzes auf der Oberfläche von Pellets in größerem Umfang gebildet wird als im Kükenalleinmehl. Im Dünnschichtchromatogramm unterschieden sich die Futtermittel im Hinblick auf die Intensität der blauvioletten Fluoreszenz des Stoffes nicht voneinander.

Das pelletierte Geflügelfutter wies folgende Zusammensetzung auf:

30,00 % Mais	2,50 % Mineralstoffmischung f. Gefl.
30,00 % Weizen	2,00 % Fischmehl
8,30 % Weizenholzmehl	2,00 % Malzkeime, getr. u. zerkl.
7,00 % Sojaschrot, extra	2,00 % Melasse
5,00 % Weizenkleie	1,00 % Futterfett
5,00 % Maiskleberfutter	0,20 % Vitamin-Vormischung f. Gefl.
4,00 % Luzernegrasgrünmehl	1,00 % Tiermehl
100,00 %	

mit Ethoxyquin und Coccidiostaticum (60 mg Amprolium und 4,8 mg Ethopabate je kg Fertigfutter)

Es handelte sich dabei um ein Junghennenalleinfutter (All-Mash J, Mischfutter nach DLG-Standard vom Feldmochinger Kraftfutterwerk Dr. ZENTZ & Co Nachf.).

Die Tiere wurden ebenfalls nach sieben Tagen durch Genickschlag getötet und von jeweils drei Tieren Organe für die histologische Untersuchung entnommen.

3.4.3.2.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Keines der Versuchstiere verendete während der Dauer des Versuches. Störungen des Allgemeinbefindens waren nicht zu beobachten und bei der Sektion der getöteten Tiere ließen sich keine pathologisch-anatomischen Veränderungen an den inneren Organen feststellen.

Die freundlicherweise von den Instituten für Tierpathologie der Universität München übernommene histologische Untersuchung der in Formalin konservierten Organe Leber, Nieren und Milz ergab im Falle der intraperitonealen Verabreichung der unverdünnten Eluate (einfacher und doppelter Extrakt) "eine fleckförmige ausgeprägte kleintropfige Leberzellverfettung, die sich graduell in beiden Gruppen nicht deutlich voneinander unterscheiden läßt; Organe Nieren und Milz sind ohne Befund".

Nach oraler Applikation des verpilzten Futters war dagegen bis auf eine Niere mit herdförmiger Verfettung von Epithelien einzelner Tubuli contorti kein Befund zu erheben.

Die nach i.p. Applikation der Eluate in der Leber der Versuchstiere aufgetretenen Veränderungen können mit einer Mykotoxinwirkung interpretiert werden. Allerdings bedarf dieser Befund noch einer Absicherung durch weitere Experimente, denn immerhin wurde das Eluat mit einer, wenn auch kleinen Menge eines organischen Lösungsmittel appliziert, welches in der verwendeten Konzentration allein nicht für den Makroorganismus toxisch ist, in Verbindung mit dem unterdosierten Gift jedoch eine additive Wirkung entfalten kann. Im Hühnerembryotest zeichnete sich ein solcher Effekt allerdings nicht ab.

Dieser an der Maus erhobene Befund aber mag als Hinweis gelten, daß es sich bei dem näher zu charakterisierenden mikrobiellen Stoffwechselprodukt wohl um ein Mykotoxin handelt, jedoch wahrscheinlich nicht um eines von der Giftigkeit der Aflatoxine. Trifft das zu, dann waren sicher die von diesem Stoff geprüften Mengen zu klein, um in der relativ kurzen Zeitspanne in vivo eine Giftwirkung zu entfalten. Es besteht dadurch auch die Möglichkeit, daß diese Mengen im Eitest durch die heranwachsenden Embryonen "entgiftet" werden konnten.

3.4.3.3 Untersuchung von Eluaten auf Cytotoxizität gegenüber Epithelzellen tierischer Gewebe

3.4.3.3.1 Beschreibung der beim Zellkulturtest angewandten Technik

Bei der Anwendung des Zellkulturtestes, wie er von GEDEK, B. (1972) zur Bestimmung der LC_{50} von Mykotoxinen beschrieben ist und bereits für die Prüfung der Toxizität des Ethoxyquin herangezogen wurde (s.S. 98) gelangten abermals Eluate des mikrobiellen Stoffwechselproduktes zur Untersuchung.

Die hierfür erforderlichen Extrakte wurden wiederum gewonnen aus dem mit *Aspergillus flavus*, Stamm DORN verpilzten Kükenalleinmehl. Die mit den Eluaten hergestellten Gebrauchslösungen enthielten

I : Eluate von zwei Extrakten in 0,1 ml DMF + 9,9 ml Zellkulturmedium = doppelter Extrakt,

II : Eluat eines Extraktes in 0,2 ml DMF + 9,9 ml Zellkulturmedium = einfacher Extrakt,

III: Eluat eines Extraktes in 0,2 ml DMF + 19,8 ml Zellkulturmedium = einfacher Extrakt, 1. Verdünnungsstufe,

IV : 10 ml Lösung III im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt = einfacher Extrakt, 2. Verdünnungsstufe,

V : 10 ml Lösung IV im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt = einfacher Extrakt, 3. Verdünnungsstufe,

VI : 10 ml Lösung V im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt = einfacher Extrakt, 4. Verdünnungsstufe,

VII: 10 ml Lösung VI im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt = einfacher Extrakt, 5. Verdünnungsstufe.

Als Kontrolle diente eine Lösung aus 0,1 ml DMF + 9,9 ml Medium (K_1), respektive 10,0 ml reines Kulturmedium (K_2).

Die erforderliche Zahl von Zellkulturröhrchen mit dichten Epithelzellen-Monolayers wurden aus Sekundärkulturen nicht embryonaler Kälbernieren gewonnen und hierzu folgende Medien verwendet:

1. Zur Abtrypsinierung der Zellen von der Rouxschalenwand:

25 ml Versen, 1 %ig,

50 ml Trypsin, 1,25 %ig,

100 ml Saline, 10fach (PBS ohne Calcium und Magnesium)

ad 1000 ml + Antibiotika (übliche Zusammensetzung),

2. als Anzuchtmedium:

Earle-MEM (Minimum Essential Medium),
Antibiotika (100 I.E. Penicillin + 100 μ g Streptomycin),
5 % FKS (Foetales Kälberserum; ohne Laktalbumin!) und

3. als Erhaltungsmedium:

Earle-MEM + Antibiotika + 2 % foetales Kälberserum.

Im letzteren wurden die abgestuften Mengen der Eluate aufgenommen.

3.4.3.3.2 Resultate und deren Interpretation

Die Ergebnisse dieser Prüfung gehen im einzelnen aus der Tabelle 25 hervor.

Eine Verimpfung von Eluaten des näher zu charakterisierenden mikrobiellen Stoffwechselproduktes, gewonnen aus 50 respektive 100 g mit *Aspergillus flavus*, Stamm DORN verpilzten Geflügelfutters, bewirkten bereits innerhalb von 24 Stunden eine totale Lysis des Zellrasens. Auch Verdünnungen des Eluates einer 50 g Probe erwiesen sich noch bis zur Verdünnung 1:80 im ersten Versuch, im zweiten Versuch bis 1:160 als toxisch. Bei Zugrundelegung der näherungsweisen Bestimmung von Titern nach KÄRBER (1931) ergaben sich, bezogen auf den Ansatz von jeweils vier Zellröhrchen pro Verdünnungsstufe, Werte von $10^{-1,35}$ bzw. $10^{-1,7/-1,95}$. Damit erwies sich das mikrobielle Stoffwechselprodukt im zweiten Versuch als zelltoxischer gegenüber dem geprüften Zellsystem als im ersten Versuch. Es dürfte dies darauf zurückzuführen sein, daß sich bei der Verpilzung eines Futtermittels ein mikrobielles Stoffwechselprodukt nicht immer akkurat in der gleichen Menge anreichert; auch dann nicht, wenn die äußeren Bedingungen eingehalten werden.

Die Untersuchungen führten zu der wesentlichen Feststellung, daß das mit Aflatoxin B_1 und Ethoxyquin im Dünnschichtchromatogramm interferierende mikrobielle Stoffwechselprodukt für ruhende Zellen cytotoxisch ist und deshalb künftig mykotoxikologische Beachtung finden sollte. Da eine reine Gewinnung des Stoffes wegen der unbefriedigenden Auftrennung im Dünnschichtchromatogramm bisher nicht gelang, ist es allerdings vorerst noch nicht möglich, die Giftigkeit des Stoffes in Beziehung zur Toxizität des Aflatoxin B_1 zu setzen. Dazu ist neben der qualitativen auch eine quantitative Erfassung des Stoffes erforderlich.

Tabelle 25: Ergebnisse der Prüfung des näher zu charakterisierenden mikrobiellen Stoffwechselproduktes im Zellkulturtest (ENK-Sekundärkulturen)

Konzentration des Stoffes	Beurteilung der Cytotoxizität nach	
	24 Std.	$\bar{X}$ 48 Std.
1. Versuch:		
Elnat des doppel- ten Extraktes	90 % Lysis	100 % Lysis
Elnat des ein- fachen Extraktes	90-100 % Lysis	100 % Lysis
Verdünnung 1:20	80- 90 % Lysis	80-100 % Lysis
Verdünnung 1:40	5 % Lysis	5 % Lysis
Verdünnung 1:80	10 % Lysis	10 % Lysis
Verdünnung 1:160	kein Effekt	kein Effekt
Verdünnung 1:320	kein Effekt	kein Effekt
2. Versuch:		
Verdünnung 1:20	100 % Lysis	100 % Lysis
Verdünnung 1:40	80 % Lysis	90 % Lysis
Verdünnung 1:80	80 % Lysis	85 % Lysis
Verdünnung 1:160	75 % Lysis	95 % Lysis
Verdünnung 1:320	kein Effekt	25 % Lysis
Kontrolle K ₁	kein Effekt	kein Effekt
Kontrolle K ₂	kein Effekt	kein Effekt

3.4.3.4 Überprüfung der antibiotischen Aktivität von Eluaten im Agar-Lochtest

3.4.3.4.1 Anwendung des Verfahrens

Um schließlich noch die antibiotische Aktivität des mikrobiellen Stoffwechselproduktes näher zu bestimmen, wurden die Extrakte aus verschiedenen Futteranreicherungen und Eluate der blauvioletten Fluoreszenz im bereits beschriebenen Agar-Lochtest geprüft.

Extrakte und Eluate wurden hierzu wiederum in 0,1 ml DMF + 0,1 ml RAF aufgenommen. Damit der Effekt besser beurteilt werden konnte, welcher auf das mikrobielle Stoffwechselprodukt zurückzuführen ist, erfolgte parallel zu den verpilzten Proben auch eine Testung von Extrakten, gewonnen aus den Ausgangsmaterialien, die sich im Dünnschichtchromatogramm als frei von diesem Stoff erwiesen hatten.

3.4.3.4.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Es zeigte sich abermals, daß bei der Testung von Extrakten eine Aussage, ob der gegenüber dem Testkeim gebildete Hemmhof auf bestimmte im Futtermittel enthaltene antibiotische Stoffe zurückzuführen ist, nicht möglich ist. Unabhängig davon, ob das Kükenalleinmehl oder die Rohstoffe Mais, Weizen und Hafercreme nach der Verpilzung mit *Aspergillus flavus*, Stamm DORN oder unverschimmelt mit dem üblichen Gehalt an Mikroorganismen untersucht wurden, in jedem Falle traten Hemmhöfe auf, die auch im Hemmhofdurchmesser nahezu einander entsprachen.

Wenn auch bereits herausgestellt wurde, daß von der Extraktion herührende Reste von Chemikalien das Ergebnis beeinflussen können, so können diese Stoffe letztlich doch keineswegs allein für die beobachteten Hemmhöfe verantwortlich sein. Da die Eluate der blauvioletten Fluoreszenz entsprechend dem Aflatoxin B₁ und Ethoxyquin eine antibakterielle Wirkung beim In-vitro-Test entfalteten, verdient das mikrobielle Stoffwechselprodukt ebenso als antibiotischer Stoff angesprochen zu werden.

Aus der Beziehung zwischen den Hemmhofdurchmessern von Extrakt und Eluat ließ sich allerdings bei diesem Test nicht ablesen, ob dieser Stoff stärker oder geringer antibakteriell wirksam ist als das Afla-

toxin B₁. Es herrschte weitgehende Übereinstimmung, die aber keine allzuweiten Schlußfolgerungen zuläßt hinsichtlich der antibiotischen Aktivität der Verbindungen, weil keine der bisher für die Prüfung dieser Eigenschaft zur Verfügung stehenden Methoden im Resultat befriedigen.

4. DISKUSSION

Die Besprechung des Schrifttums hatte verschiedene die Mykotoxin-diagnostik in Futtermitteln erschwerende Fakten ergeben, wofür vor allem drei Gründe anzuführen sind, daß die heutigen dünn-schichtchromatographischen Nachweisverfahren für toxische Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen nicht vollauf befriedigen.

Der eine dieser Gründe stellt die für diagnostische Zwecke zu geringe Anzeige im Dünnschichtchromatogramm von Stoffen mit hoher Toxizität dar. Diacetoxyscirpenol und Rubratoxin B sind erst oberhalb einer Konzentration von >10 ppm physikalisch-chemisch nachweisbar, während sie in weitaus geringerer Dosierung bereits den tierischen Organismus schädigen und deshalb mit höherer Empfindlichkeit erfaßbar sein sollten (EDWARDS und WOGAN, 1968; HAYES und WILSON, 1968; GEDEK, B. und HOFMAN, 1970; STOLOFF et al., 1971).

Ein weiterer Grund ergibt sich daraus, daß zwar manche Mykotoxine wie zum Beispiel das Aflatoxin B₁ auch noch in einer Menge von 1-5 ppb in einem Futtermittel festgestellt werden können (GOLDBLATT, 1969), daß aber eine große Zahl von Faktoren den Nachweis stören kann und Fehlbeurteilungen durch sich ähnlich verhaltende Pflanzeninhaltsstoffe, Antioxydantien und andere Schimmelpilzstoffwechselprodukte sowie durch mikrobielle und physikalisch-chemische Prozesse, die auf das Produkt einwirken können, möglich sind.

Als dritter Grund ist anzuführen, daß die Mehrzahl der heute etwa 300 bei der Umsetzung von organischer Materie gebildeten Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze (MEYER und LEISTNER, 1969) vorläufig noch vollständig dem Nachweis entgehen. Es betrifft dies nicht nur die Stoffwechselprodukte, die teilweise Pigmente oder antibiotische Stoffe darstellen und die als potentielle Toxine (SPECTOR, 1957; MAJUMDER et al., 1965) geführt werden, da für sie der Nachweis einer Giftigkeit für Makroorganismen noch nicht erbracht worden ist. Sondern auch einige der 60 als Mykotoxine bereits näher charakterisierten Stoffe von Schimmelpilzen sind mit den Methoden der Routinediagnostik noch nicht feststellbar (MEYER und LEISTNER, 1969; FRANK, 1969 a; STOLOFF et al., 1971).

Wegen der Vielzahl von Stoffen, die in einem Schadensfall beim Tier durch ein durch Pilze mikrobiell verändertes Futtermittel in Be-

tracht zu ziehen sind, werden auch in Bezug auf die Vielseitigkeit und nicht nur hinsichtlich der Empfindlichkeit an die Nachweisverfahren besondere Anforderungen gestellt. Da nach den Angaben in der Literatur von der Mehrzahl der Stoffwechselprodukte von verderbniserregenden Pilzen eine antibiotische Aktivität zu erwarten ist (BILAI, 1963; MILLER, 1961), bot sich durch eine Kombination biologischer Antibiotikabestimmungsverfahren mit der physikalisch-chemischen Methode des Nachweises über die Dünnschichtchromatographie eine Möglichkeit der Verbesserung der bisherigen Verfahrenstechniken an. Immerhin hat sich eine solche Handhabung beim Nachweis von Antibiotika im Futtermittel bereits bewährt (MANTEN, 1964). Da den bereits näher definierten Mykotoxinen (a.S. 3 ff.) bei Verwendung bestimmter Fließmittel auch entsprechende sie charakterisierende Rf-Werte zuzuordnen sind, wurde von der kombinierten Anwendung von Dünnschichtchromatogramm und Bioautogramm auch eine diagnostisch verwertbare Spezifität erwartet.

Die Prüfung von Extrakten und Eluatn verschiedener beanstandeter Futtermittel mit unterschiedlichen Verfahren, wie sie zur Bestimmung von Antibiotika in Rohstoffen und Futtermischungen, sowie für die Empfindlichkeitstestung von Mikroorganismen gegenüber antibiotisch wirksamen Stoffen empfohlen werden (KLEIN, 1957; GROVE und RANDALL, 1955; ZÄHNER, 1965), zeigte jedoch nicht den gewünschten Erfolg.

Bei der Anwendung der Kontaktmethode und der "umgekehrten" Direktmethode dürften physikalisch-chemische Vorgänge für das Testergebnis verantwortlich sein. Zu geringe Diffusionszeit und die schlechte Löslichkeit der Stoffe dürften zum negativen Resultat geführt haben, nicht allein eine eventuell für die Wachstumshemmung der Testkeime zu geringe Toxinmenge. Bei der Durchführung der Direktmethode mit der unmittelbaren Übersichtung der entwickelten DC-Platte mit einem bereits mit dem Testkeim beimpften Agar war immerhin die 150 µl-Menge Aflatoxin B₁+G₁-Standardlösung mit einer Wachstumshemmung des Bacillus-Stammes angezeigt worden.

Die weiteren Tests mit den aus verschiedenen aflatoxinhaltigen Futtermitteln hergestellten Extrakten befriedigten jedoch auch nicht, obwohl bei dieser Technik physikalisch-chemische Vorgänge, die bei den ersten beiden Methoden störend gewirkt hatten, ausgeschaltet werden konnten. Es waren zwar beim Test bei einigen Futtermischungen

Hemmeffekte zu verzeichnen gewesen, sie standen aber in keinerlei Beziehung zum, nach dem Dünnschichtchromatogramm errechneten, Aflatoxin B₁-Gehalt, zu den Schimmelpilzkeimzahlen, den im Futter nachgewiesenen Schimmelpilzspecies oder der Zusammensetzung des Futters.

Die als Reinsubstanz im Agar-Lochtest geprüften Mykotoxine mit hoher Giftigkeit für Vogel- und Säugerorganismen hatten sich zwar innerhalb bestimmter Grenzen als wenig oder garnicht antibiotisch aktiv erwiesen. Von den gegenüber Makroorganismen nur schwach toxisch wirkenden Mykotoxinen wären aber auf Grund ihrer in der Giftigkeit gegenüber Mikroorganismen gesteigerten Effektivität wenigstens Hemmeffekte gegenüber den Testkeimen zu erwarten gewesen (CANTINI et al., 1968; MOREAU, 1968).

Die Unregelmäßigkeit in den aufgetretenen Hemmzonen läßt es jedoch wenig glaubhaft erscheinen, daß diese diagnostisch nicht verwertbaren Effekte auf die schwachen Mykotoxine mit der gegenüber den starken Mykotoxinen erhöhten antibiotischen Aktivität zurückzuführen sein sollten. Es ist vielmehr in Betracht zu ziehen, ob nicht durch die dünnschichtchromatographische Auftrennung des aus 50 g-Probe eines Futtermittels hergestellten Extraktes eine zu hohe Verdünnung der Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze bewirkt wurde, so daß diese wohl bei Eigenfluoreszenz im Dünnschichtchromatogramm wahrgenommen werden können, aber in der vorliegenden Konzentration keine antibiotische Aktivität, die zur Hemmstoffbildung ausreicht, mehr zu entfalten vermögen.

Daß diese Vermutung auch einen realen Hintergrund hat, ergibt sich aus dem Resultat der Anwendung des Agar-Lochtestes zur Prüfung der gleichen und anderen aus Futtermitteln hergestellter Extrakte, sowie aus der Testung von Eluaten mykotoxinverdächtiger Stoffe, die nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung gewonnen wurden. Mit einer einzigen Ausnahme zeigten 35 Extrakte und Eluate unter Bildung eines Hemmhofes die Anwesenheit antibiotisch wirksamer Substanzen an.

Es konnte zwar ermittelt werden, daß Reste von Chemikalien des angewandten Extraktionsverfahrens nach PONS et al. (1966 a) auch einen hemmenden Einfluß auf das Bakterienwachstum auszuüben vermochten, daß aber diese Stoffe nicht allein dafür verantwortlich gemacht werden können, da Eluate bestimmter im Dünnschichtchromatogramm fluoreszierender Stellen, die all-

gemein chemisch als reiner zu betrachten sind als die Extrakte, bis auf die eine Ausnahme auch noch mit antibiotischer Aktivität im Agar-Lochtest anzeigten. Sechsmal war der Hemmhof sogar gleich groß und einmal größer als der des Extraktes. Bei der Testung der Eluate konnten möglicherweise mit Aflatoxin B_1 interferierende Pflanzeninhaltsstoffe, Schimmelpilzprodukte und das Antioxydans Ethoxyquin das Testergebnis beeinflussen. Dem Futter beigegebene Antibiotika dürften jedoch, so weit sie überhaupt noch in der Probe als solche vorlagen, eliminiert worden sein.

Auf Grund der vorliegenden Resultate ist weder eine Vereinfachung, noch eine Verbesserung der Mykotoxindiagnostik durch die kombinierte Anwendung von Dünnschichtchromatogramm und Bioautogramm auf der Basis von Kontakt- oder Direktmethode möglich. Die Verwendung des Agar-Lochtestes zur Absicherung eines dünnenschichtchromatographisch erhaltenen Mykotoxinverdacht hat anscheinend nur dann einen Sinn, wenn er, wie beim Hühnerembryo- und Zellkulturtest, erst nach der Gewinnung von Eluaten der verdächtigen Stoffe erfolgt. Andernfalls können viele Begleitstoffe das Ergebnis verfälschen.

Da der Aussagewert dieser zusätzlichen Prüfung um so höher sein dürfte, je bessere eine Auftrennung der Stoffe im Dünnschichtchromatogramm gelingt, wurde hierin eine weitere Aufgabe gesehen, zur Verbesserung der Analytik der Mykotoxine beizutragen. Deshalb konzentrierten sich die anschließenden Untersuchungen darauf, Fließmittel zu finden, durch die dies gewährleistet wird.

Bei der routinemäßigen Untersuchung von Mischfutter auf den Gehalt an Aflatoxinen stören die mit Aflatoxin B_1 interferierenden Substanzen besonders. Blauviolette Fluoreszenzen, die in erster Linie das dünnenschichtchromatographische Ergebnis des Aflatoxin B_1 zu beeinflussen schienen, wurden deshalb weiter verfolgt.

Die Untersuchung der diese Fluoreszenzen vornehmlich verursachenden Verbindungen ergaben grundsätzlich verschiedene Stoffe. Sie rührten zum einen vom handelsüblichen Zusatz von Ethoxyquin her, obwohl dieses oder dessen Begleitstoffe eigentlich nach der Reinigung über eine Chromatographiesäule nicht im Extrakt erscheinen sollten (STEFANIAK, 1969). Zum anderen versteckte sich dahinter auch ein Stoffwechselprodukt des *Aspergillus flavus* LINK, welches von einem aus Geflügelfutter isolierten Stamm dieser Species wiederum nur im Geflügelfutter gebildet wurde.

Da Ethoxyquin in der Praxis vor allem als Zusatz von Futtermischungen für das Geflügel Verwendung findet, hat dieses möglicherweise nicht nur mit Aflatoxin B_1 , sondern auch schon dünn-schicht-chromatographisch mit den anderen Stoffwechselprodukten von Pilzen interferiert.

Durch die Erprobung weniger gebräuchlicher Fließmittelsysteme wurde eine klare Abtrennung der auf Ethoxyquin zurückzuführenden blauvioletten Fluoreszenz erreicht. Toluol-Äthylacetat-Ameisensäure (90 %ig) (5:4:1) stellt das geeignetste Fließmittel sowohl bei der eindimensionalen, als auch der zweidimensionalen Auftrennung nach dem Verfahren nach SEHER (1959) dar. Es erwies sich nur als bedingt tauglich für die Trennung des mikrobiellen Stoffwechselproduktes des *Aspergillus flavus*-Stammes DORN von Aflatoxin B_1 .

Der Nachweis, daß es sich bei den abzutrennenden Fluoreszenzen um Ethoxyquin und seine Begleitstoffe handelte, wurde durch die Verwendung einer Ethoxyquin-Standardlösung, hergestellt aus einer 70 %igen Ethoxyquin-Vormischung, erbracht, die sich in handelsüblichen Dosierungen sowie nach Eluierung aus dem Futter für Hühnerembryonen und im Zellkulturtest als atoxisch erwies. Bei der Anwendung der PONS et al.-Methode (1966 a) zur Extraktion und von Methanol in Chloroform (3:97) als Fließmittel kann es identifiziert werden, wenn mit einem internen Standard (GOLDBLATT, 1969) gearbeitet wird. Sollten jedoch biologische Testverfahren zur Absicherung eines dünn-schicht-chromatographischen Aflatoxin B_1 -Nachweises ergänzend eingesetzt werden, wie sie beispielsweise von GEDEK, B. (1972) empfohlen wird, muß Toluol-Äthylacetat-90 %ige Ameisensäure (5:4:1) Anwendung finden. Es dürfte dadurch nicht nur die eventuelle Eluierung des Aflatoxin B_1 erleichtert sein, sondern auch die Beurteilung aller nicht von Ethoxyquin herrührender blauvioletter Fluoreszenzen. Außerdem vermag es bei Verwendung von Mikroorganismen als biologische Testkeime dann nicht mehr den Nachweis zu stören, denn es hatte sich im Agar-Lochtest als antibiotisch erwiesen.

Bei der Anwendung des Testes von CLEMENTS (1968 a und b) zur Bestätigung eines dünn-schicht-chromatographischen Nachweises von Aflatoxin B_1 muß es auf jeden Fall zuvor durch die Entwicklung des Dünn-schicht-chromatogrammes in Toluol-Äthylacetat- 90 %ige Ameisen-

säure (5:4:1) entfernt werden. Es hat sich gezeigt, daß es bei dieser Art der Entwicklung am Startpunkt hängen bleibt.

Die vom mit *A. flavus* verpilzten Geflügelfutter herrührende blau-violette Fluoreszenz, die sich im Gegensatz zum Ethoxyquin mit dem gleichen Fließmittel nicht vollständig von anderen blauen Fluoreszenzen und vom Aflatoxin B₁ abtrennen ließ, zeigte ebenfalls im Agar-Lochtest mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* an, so daß dieser Test, wie WALLHAUSSER (1967) anführt, einen Universaltest darstellt, jedoch nicht nur mit Vorteilen, sondern auch mit den Nachteilen, die sich vor allem aus der Anzeige nicht mikrobiell gebildeter Stoffe ergeben. Der Vorteil der leichten Handhabung des Testes mit Mikroorganismen wird verkauft mit einem wenig spezifischen Testergebnis.

Hühnerembryo- und Zellkulturtest haben diesen gegenüber einen höheren Aussagewert, da sie gegenüber biologischen Giften im Gegensatz zu den giftigen Chemikalien mit höherer Empfindlichkeit reagieren, wenn prinzipiell eine Empfänglichkeit für ein bestimmtes Gift bei dem Testorganismus besteht (GEDEK, B., 1972; BEHRINGER, 1972). Deshalb erwies sich wohl auch das Stoffwechselprodukt des *A. flavus* im Zellkulturtest im Gegensatz zum Ethoxyquin als cytotoxisch. Es rief innerhalb eines ausgebildeten Rasens von Kälbernierenepithelzellen noch in einer Verdünnung von 1:80 und 1:160 Lysis hervor, während sich eine die Konzentration im Futter mehrfach übersteigende Menge Ethoxyquin gegenüber des gleichen Zellsystems noch als atoxisch zeigte.

In seiner Wirkung auf Zellen tierischer Gewebe gleicht es dem Ochratoxin A und Rubratoxin B, welche wie das blauviolett fluoreszierende *A. flavus*-Stoffwechselprodukt im Hühnerembryotest nur geringgradig oder gar nicht anzeigen (vgl. hierzu GEDEK, B., 1972). Die für Mäuse nur geringe Toxizität zielt auch in diese Richtung (EDWARDS und WOGAN, 1968; PURCHASE und THERON, 1968).

Da die als Haemorrhagisches Syndrom oder Moldy Feed Toxicosis in der Literatur beschriebene Krankheit des Geflügels nicht allein durch die Aflatoxine, sondern auch noch durch eine Reihe, bisher noch nicht näher charakterisierte Stoffwechselprodukte von *A. flavus* und anderer verderbniserregender Schimmelpilze beim Huhn hervorgerufen werden soll (FORGACS und CARLL, 1962; FORGACS, 1966), besteht die Möglichkeit, daß das nachgewiesene Stoffwechselprodukt

eines von diesen darstellt, zumal bei der Verschimmelung für Rind oder Schwein bestimmter Futtermittel im Dünnschichtchromatogramm der Extrakte es nicht nachzuweisen war. Da es im Geflügelfutter unabhängig von dessen Zusammensetzung vorkam, kann es sich dabei nicht um einen Pflanzeninhaltsstoff oder ein Futteradditiv handeln.

Bezieht man die von A. flavus als Stoffwechselprodukte näher beschriebenen Stoffe in die Betrachtung ein, so steht bei fast allen diesen Stoffen wegen der Abweichung in den physikalisch-chemischen oder biologischen Eigenschaften eine Identität nicht in Frage. Im Falle von Oxalsäure ist sie auszuschließen, weil nach oraler Aufnahme dieses A. flavus-Stoffwechselproduktes akute Gastritis und eine rasche Zerstörung des Serumkalziums mit entsprechenden Folgeerscheinungen (DU BOIS und GEILING, 1959; WILSON und WILSON, 1961) nicht auftraten. Um Kojisäure kann es sich ebenfalls nicht handeln, da diese zwar in Aceton gut, aber in Chloroform dagegen nur gering löslich ist (YABUTA, 1924; u.a.), so daß sie bei der Anwendung der PONS et al.-Methode (1966 a) im Extrakt nicht vorliegen kann. Tremorgene Substanzen fluoreszieren im UV-Licht nicht und können deshalb im Dünnschichtchromatogramm nur als dunkle Flecke mit einem höheren Rf-Wert als die Aflatoxine wahrgenommen werden (WILSON und WILSON, 1964). Außerdem sind sie antibiotisch inaktiv (WILSON, 1966). Die B-Nitropropionsäure greift wie alle organischen Nitro-Verbindungen bei Entfaltung einer toxischen Wirkung am Gefäßsystem an (SOLJMAN, 1957). Die histologische Untersuchung der Versuchstiere ergab dafür jedoch keine Anhaltspunkte. Das Stoffwechselprodukt verhielt sich aber wie ein schwaches Hepatoxin ähnlich der Byssochlaminsäure oder dem diesen verwandten Rubratoxin B (GEDEK, B., 1971 und 1972). Im Lebertoxizitätsversuch mit Meerschweinchen hatte sich letzteres Mykotoxin erst in einer 128fach höheren Konzentration als Aflatoxin B₁ als hepatotoxisch erwiesen (GEDEK, B. und HOFMAN, 1970). Gegenüber Zellkulturen zeigte es wie das A. flavus-Stoffwechselprodukt mit Cytotoxizität in kleineren Mengen an. Hier liegt das Verhältnis zur zellschädigenden Wirkung des Aflatoxin B₁ bei 1:40 (GEDEK, B., 1972). In Kombination mit Aflatoxin B₁ erwies sich das Rubratoxin B bei Ratten als stärker lebertoxisch als allein (EDWARDS und WOGAN, 1968), so daß wegen dieses toxizitätssteigernden Effektes auch ein Aflatoxin B₁-vortäuschendes A. flavus-Produkt künftig die gleiche Beachtung finden sollte, wie beispiels-

weise das Aflatoxin B_1 .

Im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit kann dazu nur die Anregung gegeben werden, denn die endgültige Bestimmung des Toxincharakters des mit der PONS et al.-Methode (1966 a) nachweisbaren, unter Umständen neuen Stoffwechselproduktes verderbniserregender Aspergillen ist nicht die Aufgabe dieser Arbeit, die sich mit der Nachweisbarkeit solcher Stoffe zu beschäftigen hatte.

Hinsichtlich der Eigenschaften wie Löslichkeit in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Hitzebeständigkeit und antibiotische Aktivität zeigt das Stoffwechselprodukt Übereinstimmung mit der von *A. flavus* gebildeten Aspergillinsäure (WILSON, 1966). Da aber von dieser Verbindung keine zusätzlichen Daten bekannt sind, können keine weiteren Schlüsse gezogen werden. Derartige Eigenschaften treffen auch für Stoffwechselprodukte von Pilzen zu, die keine Mykotoxine darstellen (MILLER, 1965; BILAI, 1963).

Eine Identität mit dem von *A. flavus* gebildeten Aflatoxin B_1 vortäuschenden Substanzen, wie sie als solche in der Literatur schon beschrieben sind (WILSON et al., 1968), scheint auch nicht zu bestehen, da dieses Stoffwechselprodukt im Gegensatz zu den anderen Produkten des *A. flavus*-Stoffwechsels durch Vorentwicklung der DC-Platten in Diäthyläther nicht abgetrennt werden konnte, und das sogar nicht einmal bei zweidimensionaler Entwicklung der DC-Platte. Das Behandeln mit Joddämpfen, welches bei von Penicillien stammender aflatoxinvortäuschender Substanzen sich bewährt hat (MISLIVEC et al., 1968), versagte bei der näheren Charakterisierung des in der Toxizität stark, aber physikalisch-chemisch nur geringgradig von Aflatoxin B_1 abweichenden Stoffwechselproduktes von *A. flavus*.

So ergaben die Versuche, daß die von WALLHÄUSSER (1967) in Kombination mit dünn-schichtchromatographischen Verfahren empfohlenen Antibiotikabestimmungsverfahren für die Routinediagnostik von Mykotoxinen in Futtermitteln aus verschiedenen Gründen nicht geeignet sind. Es bestätigte sich abermals, daß eine Verfeinerung der dünn-schichtchromatographischen Technik zu brauchbaren Ergebnissen führt. Das soll aber nicht bedeuten, daß auf biologische Testobjekte bei klarer Abtrennung der Stoffe im Dünn-schichtchromatogramm gänzlich verzichtet werden kann. Doch sollte bei der Kombination von dünn-schichtchromatographischen Verfahren mit biologischen Methoden dem

Test mit Makroorganismen oder deren Zellen der Vorzug gegeben werden, da Mikroorganismen zu wenig spezifisch anzeigen. Das beruht nicht zuletzt vor allem darauf, daß Mykotoxine im Gegensatz zu den in der Chemotherapie von Infektionskrankheiten gebräuchlichen Antibiotika in Wasser nur eine geringe Löslichkeit zeigen, so daß bei allen diesen Tests zum Nachweis von Mykotoxinen stets mit einem gewissen Anteil von organischen Lösungsmitteln gearbeitet werden muß. Mikroorganismen scheinen empfindlicher auf diese Beimengungen zu reagieren als Makroorganismen oder deren Zellen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Einhundert Extrakte aus natürlich und gezielt mit Schimmelpilzen angereicherten Misch- und Einzelfuttermitteln wurden einheitlich nach der Methode von PONS et al. (1966 a) hergestellt, dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von ~ 350 nm ausgewertet. Mykotoxinverdächtige Verbindungen wurden eluiert.

Ob und inwieweit Mykotoxine auf Grund ihrer antibiotischen Aktivität nachweisbar sind, wurde

1. mit den Reinsubstanzen von Aflatoxin B_1 , Aflatoxin G_1 , Aflatoxin $B_1 + G_1$ -Gemisch, Ochratoxin A, Diacetoxyscirpenol, Sterigmatocystin, Rubratoxin B, Byssochlaminsäure, Kojisäure, Oxalsäure, Mesoxalsäure im Agar-Lochtest überprüft,
2. mit Hilfe einer Aflatoxin $B_1 + G_1$ -Standardlösung (ROTH) unter Verwendung von üblichen Antibiotikanachweisverfahren wie
 - a) Kontaktmethode (Abklatsch- oder Reprint-Verfahren),
 - b) "Umgekehrte" Direktmethode,
 - c) Direktmethode ausgetestet und
3. mit den Futtermittelextrakten und daraus gewonnenen Eluaten mit
 - a) Direktmethode sowie
 - b) Agar-Lochtest erprobt.

Als Teststämme dienten

im Versuch 1. *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* der 0-Gruppe 86, *Staphylococcus aureus* SG 511,
im Versuch 2. a) und b) *B. cereus*, *B. subtilis*, *Staph. aureus* SG 511,
im Versuch 2. c) und 3. a) und b) *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden die im Dünnschichtchromatogramm Aflatoxin B_1 -vortäuschenden Verbindungen wie das Antioxydans Ethoxyquin und ein in der Literatur bisher noch nicht näher beschriebenes Stoffwechselprodukt des *Aspergillus flavus* LINK-Verbindungen, die in den untersuchten Futtermittelextrakten häufiger zu beobachten waren - auf folgende Eigenschaften getestet:

1. auf Abtrennbarkeit von Aflatoxin B_1 im Dünnschichtchromatogramm unter Anwendung elf verschiedener Fließmittelsysteme, sowie Joddämpfen,
2. auf ihre Toxizität gegenüber biologischen Testorganismen wie

- a) Hühnerembryonen,
- b) Zellkulturen,
- c) Mäusen (nur *A. flavus*-Metabolit),
- d) Bakterien der Species *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*.

Von den in kristalliner Form vorliegenden Mykotoxinen zeigten Aflatoxin B_1 , Aflatoxin B_1+G_1 -Gemisch, Ochratoxin A, Rubratoxin B, Kojisäure und Oxalsäure eine antibiotische Aktivität, jedoch nur in sehr hohen Konzentrationen und nicht gegenüber allen Testkeimen.

Kontaktmethode, "Umgekehrte" Direktmethode, sowie Direktmethode erwiesen sich für den Mykotoxinnachweis als ungeeignet.

Bei der Anwendung des Agar-Lochtestes störte die unspezifische Anzeige der Testorganismen. Hemmeffekte traten unabhängig davon auf, ob es sich bei den mit Aflatoxin B_1 interferierenden Substanzen um ein Stoffwechselprodukt des *A. flavus* handelte oder um eine andere Verbindung. Erst durch die Anwendung von Hühnerembryo-, Zellkultur- und Mäusetoxizitätstest konnte der Nachweis geführt werden, daß die antibiotische Aktivität in dem einen Fall von dem für den Makroorganismus untoxischen Etoxyquin herrührte, während sie im anderen Fall durch ein von *A. flavus* nur im Geflügelfutter gebildetes, vermutlich schwach giftiges Mykotoxin hervorgerufen war.

Durch die Verwendung von Toluol-Äthylacetat-90 %iger Ameisensäure (5:4:1) als Fließmittel gelang es, das untersuchte *A. flavus*-Stoffwechselprodukt im Dünnschichtchromatogramm etwas klarer als mit anderen Fließmitteln von Aflatoxin B_1 abzutrennen. Im Gegensatz zum Etoxyquin aber war eine vollständige Eliminierung der blauvioletten Fluoreszenz dieser Verbindung aus dem Rf-Bereich des Aflatoxin B_1 nicht zu erreichen.

Die Vielzahl der erhaltenen Einzelergebnisse führte zu dem Schluß, daß bei dem derzeitigen Stand der Kenntnisse über Mykotoxine eine zuverlässige Bestimmung des Gehaltes dieser Stoffe im Futtermittel nur dann möglich ist, wenn die Prüfung mit biologischen Methoden unter Verwendung der für den Mykotoxinnachweis geeigneten Testobjekte erst erfolgt, nachdem Eluate der im Dünnschichtchromatogramm als mykotoxinverdächtig festgestellten Stoffe weitgehend von Begleitsubstanzen gereinigt sind.

5. SUMMARY

One hundred extracts of feedstuffs contaminated natural or artificial with molds were won by the same method of PONS et al. (1966 a), separated by thin-layer chromatography, and observed under longwave UV-light (~ 350 nm). Mycotoxin-susceptive compounds were eluated.

If and how far mycotoxins could be detected by their antibiotic activity was examined by

1. cleaned substances of aflatoxin B_1 , aflatoxin G_1 , aflatoxin B_1+G_1 , ochratoxin A, diacetoxyscirpenol, sterigmatocystin, rubratoxin A, hyssochlaminic acid, kojic acid, oxalic acid, mesoxalic acid using the Agar-Lochtest-method,
2. aflatoxin B_1+G_1 -standard-solution (ROTH) using the usual method for detecting antibiotics like
 - a) contact-method,
 - b) "turned back" direct-method,
 - c) direct method,
3. feedstuff-extracts and their eluates using the
 - a) direct-method,
 - b) Agar-Lochtest-method.

Following test-strains were used:

- for experiment 1. *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (0-group 86), *Staphylococcus aureus* SG 511,
for experiment 2. a) and b) *B. cereus*, *B. subtilis*, *Staph. aureus* SG 511,
for experiment 2. c) and 3. a) and b) *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*.

In the next part of this work the properties of compounds suspected aflatoxin B_1 in the thin-layer chromatography and frequently found in feedstuff-extractions as the antioxydant ethoxyquin and a metabolite of *Aspergillus flavus* LINK, which is not yet described particularly, were tested:

1. their separation from aflatoxin B_1 on silica gel-plates using eleven different solvent systems and their reaction with iodine fumes,
2. their toxicity to biological testobjects like

- a) chick embryos,
- b) culture cells,
- c) mice (only *A. flavus*-metabolite),
- d) bacteria of the species *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*.

Of the mycotoxins in crystallised form alfatoxin B_1 , aflatoxin B_1+G_1 , ochratoxin A, rubratoxin B, kojic acid, and oxalic acid had an antibiotic activity, but only in very high concentrations and not to all test-strains.

Contact-method, "turned back" direct-method, and direct-method were not suitable for the mycotoxin-detection.

By using the Agar-Lochtest-method the indifferent reactions of the testorganisms irritated. There were inhibitions, independent whether the substances interfering with aflatoxin B_1 were a metabolite of *A. flavus* or an other compound. Only toxicity tests with chick embryos, culture cells and mice offer that in one case the anti-oxydant ethoxyquin which is not toxic for macroorganisms was antibacterial activ, while in the other case a probably low poisonous mycotoxin produced by *A. flavus* only in poultry feed showed this activity.

By using the developing solvent toluene-ethyl acetate-90 % formic acid (5:4:1) by the thin-layer chromatography it was able to separate the examined metabolite of *A. flavus* from aflatoxin B_1 more clear than with other solvents. In contrary to ethoxyquin there was no total elimination of the blue-violet fluorescence of this compound from the Rf-value of aflatoxin B_1 possible.

The numerous single results obtained by using different procedures led at last to the conclusion, that at the stand of present knowledge of these compounds an authentic determination of mycotoxin-contents in feedstuffs is only possible, when the test with biological methods for mycotoxin-detection of suitable testobjects comes off after getting eluates which are, in thin-layer chromatography as mycotoxins suspected and are free from accompanied compounds.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADDA, J., 1963: Die Antioxydationsmittel und das Konservieren der Milchprodukte. *Milchwissenschaft* 18, 485.
- ALLCROFT, R. and CARNAGHAN, R.B.A., 1963: Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animal fed toxic groundnut meal. *Vet. Rec.* 75, 259-263.
- ALLCROFT, R., ROGERS, H., LEWIS, G., NABNEY, J., and BEST, P.E., 1966: Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of the "milk toxin". *Nature (Lond.)* 209, 154-155.
- ANDRELLOS, P.J. and REID, G.R., 1964: Confirmatory tests of aflatoxin B₁. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 47, 801-803.
- ANDRELLOS, P.J., BECKWITH, A.C., and EPPLEY, R.M., 1967: Photochemical changes of aflatoxin B₁. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 50, 346-350.
- ARNOLD, J. und GREUEL, E., 1972: Mißbildungen bei HN1-"Nick-Chick"-Küken unter Bedingungen der Kunstbrut. *Tierärztl. Umsch.* 27, 16-24.
- ASAO, T., BÜCHI, G., ABDEL KADER, M.M., CHANG, S.B., WICK, E.L., and WOGAN, G.N., 1963: Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1706-1707.
- ASAO, T., BÜCHI, G., ABDEL KADER, M.M., CHANG, S.B., WICK, E.L., and WOGAN, G.N., 1965: The structures of aflatoxin B₁ and G₁. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 882-886.
- ASHWORTH, L.J., Jr., MCKINNEY, J., and McLEANS, J.L., 1967: Seed coat and fiber constituents of cotton seeds that may influence aflatoxin analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44, 394-396.
- BASSIR, O. and OSIYEMI, F., 1967: Biliary excretion of aflatoxin in the rat after a single dose. *Nature (Lond.)* 215, 882.
- BEHRINGER, J., 1972: Eignung des Hühnerembryotests für den Nachweis von Mykotoxinen. Inaug. Diss. Vet. Med., Universität München.
- BILAI, V.J., 1963: Antibiotic-producing microscopic fungi. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York.
- BOIS, K.P. DU and GEILING, E.M.K., 1959: Textbook of toxicology. University Press, New York, Oxford.
- BÖSENBERG, H., 1969: Das Auftreten fluoreszierender Abkömmlinge von Aflatoxin. *Arch. Hyg. Bakt.* 153, 37-40.

- BÜSENBERG, H., 1970 a: Untersuchungen über den Nachweis von Aflatoxinen. I Mitteilung. Arzneimittelforschung 20, 1157-1167.
- BÜSENBERG, H., 1970 b: Untersuchungen über den Nachweis von Aflatoxinen. II Mitteilung. Arzneimittelforschung 20, 1521-1528.
- BRIAN, P.W., DAWKINS, A.W., GROVE, J.F., HEMMING, H.G., LOWE, D., and NOWIS, G.L.F., 1961: Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti*. J. exper. Bot. 12, 1-12.
- BRÜGGEMANN, J. und ZENTZ, Ch., 1963: Zur Bestimmung von Ethoxyquin (Santoquin) in Futtermischungen. Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 18, 99-110.
- BULLOCK, E.J. and UNDERWOOD, J.G., 1962: Studies on mycological chemistry. The structure of isosterigmatocystin and an amended structure for sterigmatocystin. J. Chem. Soc. 4179-4183.
- BUTLER, W.H. and CLIFFORD, J.I., 1965: Extraction of aflatoxin from rat liver. Nature (Lond.) 206, 1045-1046.
- CAMPBELL, A.D., 1967: Report on mycotoxins. J. Ass. off. analyt. Chem. 50, 343-346.
- CAMPBELL, A.D., 1968: Analytical methods for several mycotoxins associated with foods. Proc. "Mycotoxin Research Seminar", Washington, D.C., June 8-9, 1967. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., p. 47-50.
- CAMPBELL, T.C. and SNIDER, J.H., 1969: Non-interference of seed coat constituents of cotton seeds using the PONS and GOLDBLATT aflatoxin procedure. J. Am. Oil Chem. Soc. 46, 31-33.
- CANTINI, G., CERUTI SCURTI, J., MARCHISIO, V.F. e JORIO, M., 1968: Relazione tra tossicità ed antibiosi di miceti isolata da mangini e da insilati. Allionia 14, 97-112.
- CHEN, S.-C. and FRIEDMAN, L., 1966: Aflatoxin determination in seed meal. J. Ass. off. analyt. Chem. 49, 28-33.
- CHRISTENSEN, C.M., NELSON, G.H., MIROCHA, C.J., and BATES, F., 1968: Toxicity to experimental animals of 943 isolates of fungi. Cancer Res. 28, 2293-2295.
- CIEGLER, A., LILLEROJ, E.B., PETERSON, R.E., and HALL, H.H., 1966: Microbial detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14, 934-939.
- CLEMENTS, N.L., 1968 a: Note on microbiological assay for aflatoxin B₁: A rapid confirmatory test by effects on growth of *Bacillus megaterium*. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, 611-612.
- CLEMENTS, N.L., 1968 b: Rapid confirmatory test for aflatoxin B₁, using *Bacillus megaterium*. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, 1192-1194.

- CODNER, R.C., SARGEANT, K., and YEO, R., 1963: Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnol. & Bioeng.* 5, 185-192.
- COLE, R.J. and KIRKSEY, J.W., 1971: Aflatoxin G₁ metabolism by *Rhizopus* species. *J. Agr. Food Chem.* 19, 222-223.
- CROWTHER, P.C., 1968: A metabolite of *Macrophomina phaseoli* (MAUBL) ASHBY, with thin-layer chromatographic behaviour similar to that of aflatoxin B. *Analyst* 93, 623-624.
- DALEZIOS, J., WOGAN, G.N., and WEINREB, S.M., 1971: Aflatoxin P₁: A new metabolite in monkeys. *Science* 171, 584-585.
- DAVIS, J.E., KIRKALDY, D., and ROBERTS, J.C., 1960: Studies in mycological chemistry VII. Sterigmatocystin, a metabolite of *Aspergillus versicolor* (VUILLEMIN) TIRABOSCHI. *J. Chem. Soc.* 2169-2178.
- DAVIS, N.D., SEARCY, J.W., and DIENER, U.L., 1969: Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.* 17, 742-744.
- DEREN, J., Jr. VAN and JAWORSKI, E.G., 1966: Ethoxyquin (Santoquin^A) in eggs, chicken muscle, and chicken liver. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 49, 712-714.
- DEREN, J., Jr. VAN and JAWORSKI, E.G., 1967: Collaborative study of the determination of ethoxyquin in chick tissue and eggs. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 50, 844-847.
- DETROY, R.W. and HESSELTINE, C.W., 1968: Isolation and biological activity of a microbial conversion product of aflatoxin B₁. *Nature (Lond.)* 219, 967.
- DETROY, R.W. and HESSELTINE, C.W., 1969: Transformation of aflatoxin B₁ by steroid-hydroxylating fungi. *Canad. J. Microbiol.* 15, 495-500.
- DIETRICH, H. und KUMMER, H., 1971: Über den Aflatoxingehalt von Erdnußrückständen. *Landwirtschaftl. Forsch.* 26, II Sonderheft, S. 125-129.
- DORP, D.A. VAN, ZIJDEN, A.S.M. VAN DER, BEERTHUIS, R.K., SPARREBOOM, S., ORD, W.O., JONG, K. DE, and KEUNING, R., 1963: Dihydroaflatoxin B, metabolite of *Aspergillus flavus*. Remarks on the structure of aflatoxin B. *Rec. Trav. Chim.* 82, 587-592.
- DUTTON, M.F. and HEATHCOTE, J.G., 1966: Two new hydroaflatoxins. *J. Biochem.* 101, 21-22.
- DUTTON, M.F. and HEATHCOTE, J.G., 1968: Structure, biochemical properties, and origin of aflatoxin B_{2a} and G_{2a}. *Chem. Inds. (Lond.)* 7, 418-421.

- EDWARDS, G.S. and WOGAN, G.N., 1968: Acute and chronic toxicity of rubratoxin in rats. *Fed. Proc.* 27, 552, M.I.T. Press, Cambridge, Mass.
- ENGEDRECHT, R.H., AYRES, J.L., and SINNHUBER, R.O., 1965: Isolation and determination of aflatoxin B₁ in cottonseed meal. *J. Ass. off. agric. Chem.* 48, 815-818.
- EPPLEY, R.M., 1966: A versatile procedure for the assay and preparatory separation of aflatoxins from peanut products. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 49, 1218-1223.
- EPPLEY, R.M., 1968: Screening method for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 51, 74-78.
- FISHBEIN, L. and FALK, H.L., 1970: Chromatography of mold metabolites. I. Aflatoxins, Ochratoxins and related compounds. *Chromatog. Rev.* 12, 42-87.
- FORGACS, J. and CARLL, W.T., 1962: Mycotoxicosis. *Adv. Vet. Sci.* 1, 273-382.
- FORGACS, J., 1966: Types of mycotoxicity occurring in feeds and foods. *Food Technol.* 20, 46-50.
- FRANK, H.K. und EYRICH, W., 1968: Über den Nachweis von Aflatoxinen und das Vorkommen Aflatoxin-vortäuschender Substanzen in Lebensmitteln. *Z. Lebensmittelunters. u. -Forsch.* 138, 1-11.
- FRANK, H.K., 1969 a: Vorkommen und Nachweis von Mykotoxinen. *Zbl. Bakt. I Org.* 212, 216-221.
- FRANK, H.K., 1969 b: Nachweis von Aflatoxinen in Lebens- und Futtermitteln. *Alimenta* 8, 67-69.
- FRANK, H.K., 1971: persönl. Mitteilung.
- FRANK, H.K., 1972: Mikrobiologische Verunreinigungen in Enzympräparaten für die Lebensmitteltechnologie. I. Aflatoxin und antibiotische Restaktivitäten. *Dt. Lebensmitt. Rdsch.* 68, 252-256.
- FRIED, K., 1968: Skúsenosti pri nutričnej encefalomálácii kurčiat. *Veterinárství* 18, Nr. 3, 101-104.
- FRIEDLANDER, A. and GONEN, M., 1970: Use of polyamide thin-layer chromatography for detection of aflatoxins. *Israel J. Chem.* 8, 87-91.
- GEDEK, B., 1968: Hefen als Krankheitserreger bei Tieren. Bd. 7 der Sammlung "Infektionskrankheiten und ihre Erreger", Gustav Fischer Verlag, Jena.

- GEDEK, B., 1969: Zur Bedeutung von Mykotoxinen. Die Blauen Hefte für den Tierarzt Nr. 41, 32-38.
- GEDEK, B. und HOFMANN, H., 1970: Tierexperimentelle Untersuchungen zur hepatotoxischen Wirkung von Schimmelpilzgiften. 1. und 2. Mitt., Zbl. Vet. Med. B, 17, 658-676.
- GEDEK, B., 1971: Mykotoxine in Lebensmitteln und ihre Bedeutung für die Gesundheit des Menschen. Mat. Med. Nordmark 23, 130-141.
- GEDEK, B., 1972: Biologischer Nachweis von Mykotoxinen. Zbl. Vet. Med. B, 19, 15-32.
- GILGAN, M.W., SMALLEY, E.B., and STRONG, F.M., 1966: Isolation and partial characterization of a toxin from *Fusarium tricinatum* on moldy corn. Arch. Biochem. Biophys. 114, 1-3.
- GOLDBLATT, L.A., 1969: Aflatoxin. Academic Press, New York and London.
- GROVE, D.C. and RANDALL, W.A., 1955: Assay methods of antibiotics. Antibiotic monographs 2. Medical Encyclopedia, Ind. New York.
- HAANSSEN, E. und HAGEDORN, G., 1969: Untersuchungen über das Vorkommen und Wanderung von Aflatoxin B₁ und seine Veränderung bei einigen lebensmitteltechnologischen Prozessen. Z. Lebensmittelunters. u. -Forsch. 141, 129-145.
- HAYES, A.W. and WILSON, B.J., 1968: Bioproduction and purification of rubratoxin B. Appl. Microbiol. 16, 1163-1167.
- HAYES, A.W. and WYATT, E.P., 197: Survey of the sensitivity of microorganisms to rubratoxin B. Appl. Microbiol. 20, 164-165.
- HEATHCOTE, J.G. and DUTTON, M.F., 1969: New metabolites of *Aspergillus flavus*. Tetrahedron 25, 1497-1500.
- HEUSINKVELD, M.R., SHERA, C.C., and BAUR, F.J., 1965: Note on aflatoxin analysis in peanuts, peanut meals, and peanut products. J. Ass. off. agric. Chem. 48, 448-449.
- HODGES, F.A., ZUST, J.R., SMITH, H.R., NELSON, A.A., ARMBRECHT, B.H., and CAMPBELL, A.D., 1964: Mycotoxins: Aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*. Science 145, 1439.
- HOLZAPFEL, C.W., PURCHASE, I.F.H., STEYN, P.S., and GOUWS, L., 1966 a: The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin a carcinogenic mycotoxin and its isolation from two new fungal sources. S. Afr. Med. J. 40, 1100-1101.
- HOLZAPFEL, C.W., STEYN, P.S., and PURCHASE, I.F.H., 1966 b: Isolation and structure of aflatoxin M₁ and M₂, Tetrahedron Letters 25, 2799-2803.

- HOLZAPFEL, C.W., 1968: The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* WESRLING. *Tetrahedron* 24, 2101-2119.
- HOLZAPFEL, C.W. and STEYN, P.S., 1968: zitiert in: STEYN, P.S., 1969: The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* 45, 473-475.
- HONEGGER, C.G., 1963: Influence of chamber saturation on thin film chromatography. *Helv. Chim. Acta* 46, 1730-1734.
- JACQUET, J., BOUTIBONNES, P. et TEHERANI, A., 1971: Sur quelques composants fluorescents des végétaux décelés par chromatographie en couche mince. Rapports avec la coumarine et les flavocoumarines. *C. r. Séanc. Soc. Biol.* 165, 2101-2104.
- JAYARAMAN, A., HERBST, E.J., and IKAWA, M., 1968: The bioassay of aflatoxins and related substances with *Bacillus megaterium* spores and chick embryos. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 700-702.
- JOHNSON, D.P., 1967: Spectrophotometric determination of BHA and BHT in vegetable oils. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 50, 1298-1304.
- JONGH, H. DE, BEERTHUIS, R.K., VLES, R.O., BARRETT, C.S., and ORD, W.O., 1962: Investigation of the factor in groundnut meal responsible for "turkey X disease". *Biochim. biophys. Acta* 65, 548-551.
- JONGH, H. DE, PELT, J.G. VAN, ORD, W.O., and BARRETT, C.B., 1964 a: A semi-quantitative determination of aflatoxin B₁ in groundnut meal, groundnuts, and peanut butter. *Vet. Rec.* 76, 901-903.
- JONGH, H. DE, VLES, R.O., and PELT, J.G. VAN, 1964 b: Milk of mammals fed aflatoxin-containing diets. *Nature (Lond.)* 202, 466-467.
- JOST, R. und NICOLET, J., 1969: Aflatoxinanalysen von Futtermitteln: Ergebnisse und Probleme. *Path. Microbiol.* 33, 296-307.
- KANEKO, Y. and SANADA, M., 1969: Studies on the fluorescent substances produced by *Aspergillus* fungi. (VIII). Purification and isolation of Asperopterin B and chemical properties of Asperopterin B and A. (Japanisch). *J. Ferment. Technol. (Osaka)* 47, 8-19.
- KÄRBER, G., 1931: Tabellen zur nährungsweisen Bestimmung von Titern. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. Pharmacol.* 162, 480.
- KELLNER, O. und BECKER, M., 1966: Grundzüge der Fütterungslehre. Paul Parey Verlag, Hamburg und Berlin.
- KEPPLER, J.G. and JONGH, H. DE, 1964: Aflatoxin-occurrence and composition. *Food Cosmet. Toxicol.* 2, 674.

- KIERMEIER, F. und GROLL, D., 1969: Zur Bestimmung von Aflatoxin B₁ in Käse. Z. Lebensmittelunters. u. -Forsch. 142, 120-123.
- KIERMEIER, F., 1970: Zum Nachweis von Aflatoxinen in Käse. Z. Lebensmittelunters. u. -Forsch. 144, 293-297.
- KIERMEIER, F. und BÖHM, S., 1971: Zur Aflatoxinbildung in Milch und Milchprodukten. V. Anwendung des Hühnerembryo-Testes zur Sicherung des dünnstichtchromatographischen Aflatoxin-Nachweises in Käsen. Z. Lebensmittelunters. u. -Forsch. 147, 61-64.
- KINOSHITA, R., ISHIKO, T., SUGIYAMA, S., SETO, T., IGANASI, S., and GOETZ, I.E., 1968: Mycotoxins in fermented food. Cancer Res. 28, 2296-2311.
- KLEIN, P., 1957: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- KOLB, E., 1970: Wirkstoff-Vademekum. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- KNAPSTEIN, K., 1967: Gutachtliche Stellungnahme über den Zusatz von Santoquin[®] zum Fischmehl.
- KÜHNERT, M. und BUCHHEIM, H.-J., 1968 a: Vorschlag zur dünnstichtchromatographischen Ermittlung von Mykotoxinen (besonders Aflatoxinen) in Malzkeimfuttermitteln. Mh. Vet. Med. 23, 887-890.
- KÜHNERT, M. und BUCHHEIM, H.-J., 1968 b: Entgegnung zur Stellungnahme von R. MOTZ und J. SCHULTZ zur Veröffentlichung von M. KÜHNERT und H.-J. BUCHHEIM "Vorschlag zur dünnstichtchromatographischen Ermittlung von Mykotoxinen (besonders Aflatoxin) in Malzkeimfuttermitteln". Mh. Vet. Med. 23, 892-893.
- KULIK, M.M. and HOLADAY, D.E., 1967: Aflatoxin: A metabolic product of several fungi. Mycopathol. Mycol. Appl. 30, 137-140.
- KWON, T.-W. and AYRES, J.C., 1967: The purity of aflatoxin G₁ and use of antioxydant and chelation agent on the purification of the toxin by thin-layer chromatography. J. Chromatog. 31, 420-426.
- LEE, W.V., 1965: Quantitative determination of aflatoxins in groundnut products. Analyst 90, 305-307.
- LIJINSKY, W. and BUTLER, W.H., 1966: Purification and toxicity of aflatoxin G₁. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 123, 151-154.
- LILLENVOY, E.B. and CIEGLER, A., 1968: Biological activity of sterigmatocystin. Mycopath. Mycol. appl. 35, 373-376.
- LOURIA, D.B., 1971: Aflatoxin-like substances in tobacco. V^e Congrès de la Société Internationale de Mycologie Humaine et Animale. Paris, 5-10 Juillet.

- MACHLIN, L.J., GORDON, R.S., and BISKOFF, M., 1957: In vivo anti-oxydant activity of 1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline and its metabolism in animals. Abstracts of the 132 nd meeting of the Amer. Chem. Soc., p. 93c.
- MARGALITH, P., 1967: Inhibitory effect of gossypol on microorganism. Appl. Microbiol. 15, 952-953.
- MARTEN, G., 1964: Zum Nachweis von Antibiotika in Futtermitteln. Landwirtschaftl. Forsch. 17, 209-219.
- MASRI, M.S., LUNDIN, R.E., PAGE, J.R., and GARCIA, V.V., 1967: Crystalline aflatoxin M₁ from urine and milk. Nature (Lond.) 215, 753-755.
- MAJUMDER, S.K., NARASIMIAN, K.S., and PARPIA, H.A.B., 1965: Micro-ecological factors of microbial spoilage and the occurrence of mycotoxins in foodstuffs. In WOGAN, G.N. (Ed.): Mycotoxins in foodstuffs. M.I.T. Press, Cambridge, Mass.
- MOEDLHORN, H.Ch. und BEETZ, D., 1971: Das Antioxydant Aethoxyquin als berufliches Ekzematogen bei einem Futtermitteldosierer. Berufs-Dermatosen 19, 84-91.
- MEISER, B., 1968: Zur Wirkung toxinbildender Aspergillen im tierischen Organismus. Inaug. Diss. Vet. Med., Universität München.
- MERWE, K.J. VAN DER, STEYN, S., and FOURIE, L., 1965: Mycotoxins II. The constitution of ochratoxin A, B, C, metabolites of Aspergillus ochraceus WILH.. J. Chem. Soc. 7083-7088.
- MEYER, H. und LEISTNER, L., 1969: Dokumentation der Mykotoxin-Literatur. I Mitteilung: Aflatoxine. Archiv Lebensmittelhyg. 9, 203-206.
- MILLER, M.W., 1961: The PFIZER handbook of microbial metabolites. McGraw-Hill Book company, New York, Toronto, London.
- MINTZLAFF, H.-J., 1971: Mäuse als Versuchstiere für den biologischen Nachweis der von Schimmelpilzen gebildeten toxischen Stoffwechselprodukte. Symposium zum Nachweis von Toxinen mikrobiellen Ursprungs in Lebens- und Futtermitteln. Kulmbach, 29. Juni-1. Juli.
- MIROCHA, C.J., CHRISTENSEN, C.M., and NELSON, G.H., 1967: Estrogenic metabolite produced by Fusarium graminearum in stored corn. Appl. Microbiol. 15, 497-503.
- MIROCHA, C.J., CHRISTENSEN, C.M., and NELSON, G.H., 1968: Physiologic activity of some fungal estrogens produced by Fusarium. Cancer Res. 28, 2319-2322.
- MISLIVEC, P.B., HUNTER, J.H., and TUITE, J., 1968: Assay for aflatoxin production by the genera Aspergillus and Penicillium. Appl. Microbiol. 16, 1053-1055.

- MONSANTO: Santoquin^a-Fütterungs-Antioxydants. Vorteile/Tatsachen/
Wissenschaftlicher Nachweis. Werbeschrift.
- MONSANTO: Determination of Santoquin^a antioxydant in feed and feed
ingredients. Firmeneigener Forschungsbericht.
- MOREAU, C., 1968: Moisissures toxiques dans l'alimentation.
Editions Paul Lechevalier, Paris.
- MOSS, M.O., ROBINSON, F.V., and WOOD, A.B., 1967: Observation on
the structure from *Penicillium rubrum*. *Chemy. Ind.* 755-757.
- MOSS, M.O., ROBINSON, F.V., WOOD, A.B., PAISLEY, H.M., FEENEY, J.,
1968: Rubratoxin B, a proposed structure for a bis-anhydride
from *Penicillium rubrum* STOLL. *Nature (Lond.)* 220, 767-770.
- MOTZ, R. und SCHULTZ, J., 1968: Stellungnahme zur Veröffentlichung
"Vorschlag zur Ermittlung von Mykotoxinen (besonders Aflatoxinen)
in Malzkeimfuttermitteln" von M. KÜHNERT und H.-J. BUCHHEIM.
Mh. Vet. Med. 23, 890-892.
- MURAKAMI, H., TAKASE, S., and ISHII, T., 1967: Non-productivity of
aflatoxin by japanese industrial strains of *Aspergillus*. I. Pro-
duction of fluorescent substances in agar slant and shaking
cultures. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 323-334.
- MURAKAMI, H., TAKASE, S., and KUWABARA, K., 1968 a: Non-producti-
vity of aflatoxin by japanese industrial strains of *Aspergillus*.
II. Production of fluorescent substances in rice koji, and their
identification by absorption spectrum. *J. Gen. Appl. Microbiol.*
14, 97-110.
- MURAKAMI, H., SAGAWA, H., and TAKASE, S., 1968 b: Non-productivity
of aflatoxin by japanese industrial strains of *Aspergillus*. III.
Common characteristics of the aflatoxin-producing strains.
J. Gen. Appl. Microbiol. 14, 251-262.
- NESBITT, B.F., O'KELLY, J., SARGEANT, K., and SHERIDAN, A., 1962:
Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature (Lond.)* 195,
1062-1063.
- NESHEIM, S., 1964: Note on aflatoxin analysis in peanuts and
peanut products. *J. Ass. off. agric. Chem.* 47, 586.
- NEUMANN-KLEINPAUL, A. und TERPLAN, G., 1972: Zum Vorkommen von
Aflatoxin M₁ in Trockenmilchprodukten. *Archiv Lebensmittelhyg.*
23, 128-132.
- NICOLAUS, B.J.R., CORONELLI, C. e BINAGHI, A., 1961: Applicazione
agli antibiotici della cromatografica su strato sottile.
Il Farmaco - Ed. Pr. 8, 349-370.
- NYBOM, N., 1967: Key of marking the colour of fluorescent spots
on chromatograms. *J. Chromatog.* 26, 520.521.

- POHLAND, A.E., CUSHMAC, M.E., and ANDRELIOS, P.J., 1968: Aflatoxin B₁ hemiacetal. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, 907-1000.
- POHLAND, A.E. and ALLEN, R., 1970: Stability studies with patulin. J. Ass. off. agric. Chem. 53, 688-691.
- PONS, W.A., Jr. and GOLDBLATT, L.A., 1965: The determination of aflatoxins in cottonseed products. J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 471-475.
- PONS, W.A., Jr., CUCULLU, A.F., LEE, L.S., ROBERTSON, J.A., FRANZ, A.O., and GOLDBLATT, L.A., 1966 a: Determination of aflatoxins in agricultural products: Use of aqueous acetone for extraction. J. Ass. off. analyt. Chem. 49, 554-562.
- PONS, W.A., Jr., ROBERTSON, J.A., and GOLDBLATT, L.A., 1966 b: Objective fluorometric measurement of aflatoxins on TLC-plates. J. Am. Oil Chem. Soc. 43, 665-669.
- PONS, W.A., Jr., CUCULLU, A.F., FRANZ, A.O., and GOLDBLATT, L.A., 1968: Improved objective fluorodensitometric determination of aflatoxins in cottonseed products. J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 694-699.
- PONS, W.A., Jr. and GOLDBLATT, L.A., 1969: Physicochemical assay of aflatoxins. In GOLDBLATT, L.A. (Ed.): Aflatoxin. Academic Press, New York, London.
- PURCHASE, J.F.H., 1967: Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old ducklings. Food Cosmet. Toxicol. 5, 339-342.
- PURCHASE, J.F.H. and THERON, J.J., 1968: Acute toxicity of ochratoxin A to rats. Food Cosmet. Toxicol. 6, 479-483.
- PURCHASE, J.F.H., STEYN, H.M., and PRETORIUS, H.E., 1968: The production of aflatoxin M on various substrates. Mycopath. Mycol. appl. 35, 239-244.
- PUT, H.M.C. and KRNSWIJK, J.Th., 1964: Disintegration and organoleptic deterioration of processed strawberries caused by the mould *Byssoschlamys nivea*. J. appl. Bact. 27, 53-58.
- REISS, J., 1968 a: Mycotoxine. I. Mycotoxine von *Aspergillus*-Arten. Z. Allg. Mikrobiol. 8, 303-330.
- REISS, J., 1968 b: Mycotoxine. II. Mycotoxine von *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Stachybotrys atra*, *Pithomyces chartarum* und anderen Pilzen. Z. Allg. Mikrobiol. 8, 459-474.
- ROBERTSON, J.A., Jr., LEE, L.S., CUCULLU, A.F., and GOLDBLATT, L.A., 1965: Assay of aflatoxin in peanuts and peanut products using acetone-hexane-water for extraction. J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 467-471.

- ROBERTSON, J.A., TEUNISSEN, D.J., and BOUDREAUX, G.J., 1970: Isolation and structure of a biologically reduced aflatoxin B₁. J. Agr. Food Chem. 18, 1090-1091.
- ROBERTS, B.A. and ALLCROFT, R., 1968: A note on the semi-quantitative estimation of aflatoxin M₁ in liquid milk by thin-layer chromatography. Food Cosmet. Toxicol. 6, 339.
- RODRICKS, J.V., LUSTIG, E., CAMPBELL, A.D., and STOLOFF, L., 1968 a: Aspertoxin, a hydroxy derivate of o-methyl-sterigmatocystin from aflatoxin-producing cultures of *Aspergillus flavus*. Tetrahedron Letters 25, 2975-2978.
- RODRICKS, J.V., HENERY-LOGAN, K.R., CAMPBELL, A.D., STOLOFF, L., and VERRETT, M.J., 1968 b: Isolation of a new toxin from cultures of *Aspergillus flavus*. Nature (Lond.) 217, 668.
- SAHASRABUDHE, M.R., 1964: Application of thin-layer chromatography to the quantitative estimation of antioxydants: BHA, BHT, PG, and NDGA. J. Ass. off. analyt. Chem. 47, 888-893.
- SALLMANN, H.-P., 1965: Über den Einsatz von Antioxydantien in der Tierernährung. Bilanzstudie mit 2,6 Ditertiär-butyl-hydroxyl-tolual (BHT) am Geflügel. Inaug. Diss. Vet. Med., Universität München.
- SARGEANT, K., SHERIDAN, A., O'KELLY, J., and CARNAGHAN, R.B.A., 1961: Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature (Lond.) 192, 1096-1097.
- SASAKI, M., KIKUCHI, T., ASAO, Y., and YOKOTSUKA, T., 1967: Studies on the compounds produced by molds. Part II. Fluorescent compounds produced by Japanese industrial molds (2) (Japanisch). J. Agr. Chem. Soc. Jap. 41, 154-158.
- SASAKI, M., ASAO, Y., and YOKOTSUKA, T., 1968 a: Studies on the compounds produced by molds. Part III. Fluorescent compounds produced by Japanese industrial molds (3) (Japanisch). J. Agr. Chem. Soc. Jap. 42, 288-293.
- SASAKI, M., ASAO, Y., and YOKOTSUKA, T., 1968 b: Studies on the compounds produced by molds. Part V. Isolation of non-fluorescent pyrazine compounds (2) (Japanisch). J. Agr. Chem. Soc. Jap. 42, 351-355.
- SCHEIDT, S.A. and CONROY, H.W., 1966: Detection of PG, NDGA, BHT, and BHA in fats and oils by thin-layer chromatography. J. Ass. off. analyt. Chem. 49, 807-812.
- SCHMIDT, I. und REHM, H.-J., 1968: Mykotoxine in Lebensmitteln. I Mitteilung. Bestimmung von Byssochlaminsäure. Z. Lebensmittelunters. u.-Forsch. 139, 20-22.
- SCHMIDT, I. und REHM, H.-J., 1969: Mykotoxine in Lebensmitteln. II Mitteilung. Bildung von Byssochlaminsäure in Fetten und fett-haltigen Produkten. Z. Lebensmittelunters. u.-Forsch. 141, 313-317.

- SCHOENTAL, R., 1967: Aflatoxins. *Ann. Rev. Pharmacol.* 7, 343-356.
- SCHROEDER, H.W., 1968: Metabolite of *Macrophomina phaseoli* that can confuse thin-layer chromatography identification of aflatoxin B₂. *Appl. Microbiol.* 16, 946-947.
- SCHULTZ, J. und MOTZ, R., 1966: Toxinbildende *Aspergillus flavus*-Stämme in Futtermitteln. *Arch. exper. Vet. Med.* 21, 129-140.
- SCOPPA, P. and MARAFANTE, E., 1971: Uptake of aflatoxin B₁ by plastic materials. *Experientia* 27, 414.
- SCOTT, P.M. and HAND, T.B., 1967: Method for the detection and estimation of ochratoxin A in some cereal products. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 50, 366-370.
- SCOTT, P.M. and SOMERS, E., 1968: Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *J. agric. Food Chem.* 16, 483-485.
- SCOTT, P.M., LAWRENCE, J.W., and WALBEEK, W. VAN, 1970: Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: Application to screening of fungal extracts. *Appl. Microbiol.* 20, 839-842.
- SEIER, A., 1959: Der analytische Nachweis synthetischer Antioxydantien in Speisefetten. II: Trennung und Identifizierung synthetischer Antioxydantien durch Dünnschicht-Chromatographie. *Fette Seifen* 61, 345-351.
- SHOTWELL, O.L., SHANNON, G.M., GOULDEN, M.L., MILBURN, M.S., and HALL, H.H., 1968: Factors in oats that could be mistaken for aflatoxin. *Cereal Chem.* 45, 236-241.
- SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., and GOULDEN, M.L., 1969 a: Ochratoxin A: Occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Appl. Microbiol.* 17, 765-766.
- SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., BURMEISTER, H.R., KWOLEK, W.F., SHANNON, G.M., and HALL, H.H., 1969 b: Survey of cereal grains and soybeans for the presence of aflatoxin: I. Wheats, grain sorghum, and oats. *Cereal Chem.* 46, 446-454.
- SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., GOULDEN, M.L., and VANDEGRAFT, E.E., 1970: Survey of corn for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. *Cereal Chem.* 47, 700-707.
- SIGG, H.P., MAULI, R., FLURY, E. und HAUSER, D., 1965: Die Konstitution von Diacetoxyseirpenol. *Helv. Chim. Acta* 48, 962-988.
- SINGH, Ch., 1970: Thin-layer chromatography of aflatoxins. *Anal. Biochem.* 38, 568-571.
- SOLLMAN, T., 1957: A manual of pharmacology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, U.S.A.
- SPECTOR, W.S., 1957: Handbook of toxicology. II Antibiotics. W.B. Saunders Co., Philadelphia, U.S.A.

- STACK, M. and RODRICKS, J.V., 1971: Method for analysis and chemicals confirmation of sterigmatocystin. J. Ass. off. analyt. Chem. 54, 86-90.
- STACK, M., POHLAND, A.E., DANTZMAN, J.G., and NESHEIM, S., 1972: Derivative method for chemical confirmation of identity of aflatoxin M₁. J. Ass. off. analyt. Chem. 55, 313-314.
- STAHL, E., 1967: *Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriums-handbuch*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- STEFANIAK, B., 1969: Interference of ethoxyquin in the thin-layer chromatographic estimation of aflatoxin. J. Chromatog. 44, 403-406.
- STEYN, P.S. and MERWE, K.J. VAN DER, 1966: Detection and estimation of ochratoxin A. Nature (Lond.) 211, 418.
- STEYN, P.S., 1969: The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography. J. Chromatog. 45, 473-475.
- STEYN, P.S., 1970: The isolation and absolute configuration of secalononic acid B, the toxic metabolite of *Penicillium oxalicum*. Tetrahedron 26, 51-57.
- STOLOFF, L., GRAFF, A., and RICH, H., 1966: Rapid procedure for aflatoxin analysis in cottonseed products. J. Ass. off. analyt. Chem. 49, 740-743.
- STOLOFF, L., NESHEIM, S., RODRICKS, J.V., STAK, M., and CAMPBELL, A.D., 1971: A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin, and patulin. J. Ass. off. analyt. Chem. 54, 91-97.
- STREZLECK, S. and KOGAN, L., 1966: Note on thin-layer chromatography of aflatoxin. J. Ass. off. analyt. Chem. 49, 33.
- STUBBLEFIELD, R.D., SHANNON, G.M., and SHOTWELL, O.L., 1969: Aflatoxins: Improved resolution by thin-layer chromatography. J. Ass. off. analyt. Chem. 52, 669-672.
- STUBBLEFIELD, R.D., SHANNON, G.M., and SHOTWELL, O.L., 1970 a: Aflatoxin M₁ and M₂: Preparation and purification. J. Am. Oil Chem. Soc. 47, 389-390.
- STUBBLEFIELD, R.D., SHOTWELL, O.L., SHANNON, G.M., WEISLEDER, D., and ROHWEDDER, W.K., 1970 b: Parasiticol: a new metabolite from *Aspergillus parasiticus*. J. Agr. Food Chem. 18, 391-393.
- TAUCHMANN, F., TÜTH, L., LEISTNER, L., 1971: Eine halbquantitative Methode für die Bestimmung von Patulin in Fleisch und Fleischwaren. Fleischwirtsch. 51, 1079-1080.
- TEUNISSON, D.J. and ROBERTSON, I.A., 1967: Degradation of pure aflatoxins by *Tetrahymena pyriformis*. Appl. Microbiol. 15, 1099-1103.

- THIER, H.-P., BRICOUT, J., VIANI, R., REYMOND, D. und EGLI, R.H., 1968: Scopoletin, ein Bestandteil des Rohkaffees. Z. Lebensmittelunters. u. -Forsch. 137, 1-4.
- TRAGER, W.T., STOLOFF, L., and CAMPBELL, A.D., 1964: A comparison of assay procedures for aflatoxin in peanut products. J. Ass. off. agric. Chem. 47, 993-1001.
- TRAGER, W.T. and STOLOFF, L., 1967: Possible reactions from aflatoxin detoxification. J. Agr. Food Chem. 15, 679-681.
- TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE, 1965: Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnut materials. TPI Report No. G-13, May.
- URRY, W.H., WEHRMEISTER, H.L., HODGE, E.B., and HIDEY, P.H., 1966: The structure of zeaxalenone. Tetrahedron Letters 27, 3109-3114.
- VERRETT, M.J., MARLIAC, J.-P., and McLAUGHLIN, J., Jr., 1964: Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. J. Ass. off. analyt. Chem. 47, 1003-1006.
- VOLLUM, D.I., 1971: Hypomelanosis from an antioxydant in polyethylene film. Arch. Derm. 104, 69-72.
- VORSTER, L.J. and PURCHASE, I.F.H., 1968: A method for determination of sterigmatocystin in grain and oil seeds. Analyst 93, 694-696.
- WALBEEK, W. VAN, SCOTT, P.M., and THATCHER, F.S., 1968: Mycotoxins from food-borne fungi. Canad. J. Microbiol. 14, 131-137.
- WALLHÄUSSER, K.H. und RIPPEL-BALDES, A., 1950: Die Zuverlässigkeit des antibiotischen Testes mit Diffusionsplatten. Naturwissenschaften 37, 450-451.
- WALLHÄUSSER, K.H., 1967: Antibiotica. In STAHL, E. (Ed.): Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- WALTER, A.M. und HEILMEYER, L., 1969: Antibiotika-Fibel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- WEBER, K., 1967 a: Testace etoxyquinu u kuřat se zřetelem k jeho předózování. Biol. a chem. Výzivy Zvířat (Praha) 3, Nr. 1, 67-71.
- WEBER, K., 1967 b: Testace furazolidonu e etoxyquinu u kachňat se zřetelem k jejich předózování. Biol. a chem. Výzivy Zvířat (Praha) 3, Nr. 1, 72-78.
- WEBER, K., 1972: persönl. Mitteilung.

- WIESEMAN, H.G., JACOBSON, W.C., and HARMEYER, W.C., 1967: Note on a removal of pigments from chloroform extracts of aflatoxin cultures with copper carbonate. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 50, 982-983.
- WILEY, M., 1966: Note on the analysis of aflatoxins. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 49, 1223-1224.
- WILSON, R.H., THOMAS, J.O., THOMPSON, C.R., LAUNER, H.F., and KOHLER, O., 1959: Absorption, metabolism, and excretion of the antioxidant 6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline. *J. Agr. Food Chem.* 7, 206-209.
- WILSON, R.H. and EDS, F. DE, 1959: Toxicity studies on the antioxidant, 6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline. *J. Agr. Food Chem.* 7, 203-206.
- WILSON, B.J. and WILSON, C.H., 1961: Oxalate formation in mouldy feedstuffs as a possible factor in livestock toxic disease. *Am. J. vet. Res.* 22, 961-969.
- WILSON, B.J. and WILSON, C.H., 1964: Toxin from *Aspergillus flavus*: production on food materials of a substance causing tremors in mice. *Science* 144, 177-178.
- WILSON, B.J., 1966: Toxins other than aflatoxins produced by *Aspergillus flavus*. *Bact. Rev.* 30, 478-484.
- WILSON, B.J., CAMPBELL, T.C., HAYES, A.W., and HANLIN, R.T., 1968: Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the *Aspergillus flavus* group. *Appl. Microbiol.* 16, 819-821.
- WOGAN, G.N., 1965: *Mycotoxins in foodstuffs*. M.I.T. Press, Cambridge, Mass.
- WREN, J.J. and SZCZEPANOWSKA, A.D., 1964: Chromatography of lipids in presence of an antioxidant, 4-methyl-2,6-di-tert.-butylphenol. *J. Chromatog.* 14, 405-410.
- YABUTA, T., 1924: Constitution of kojic acid, a γ -pyrone derivative formed by *Aspergillus oryzae* from carbohydrates. *L. Chem. Soc.* 125, 575-587.
- YATES, S.G., TOOKSY, H.L., and Ellis, J.J., 1970: Survey of tall-fescue pasture: Correlation of toxicity of *Fusarium* isolates to known toxins. *Appl. Microbiol.* 19, 103-105.
- YIN, L., 1969: Note on acetonitrile as an extracting solvent for aflatoxins. *J. Ass. off. analyt. Chem.* 52, 880.
- YOKOTSUKA, T., SASAKI, M., KIKUCHI, T., ASAO, Y., and NOBUHARA, A., 1967 a: Production of fluorescent compounds other than aflatoxins by Japanese industrial molds. In MATELES, R.J. and WOGAN, G.N. (Eds.): *Biochemistry of some foodborn microbial molds*. M.I.T. Press, Cambridge, Mass.

- YOKOTSUKA, T., SASAKI, M., KIKUCHI, T., ASAO, Y., and NOBUHARA, A., 1967 b: Studies on the compounds produced by molds. Part I. Fluorescent compounds produced by japanese industrial molds (Japanisch). J. Agr. Chem. Soc. Jap. 41, 32-38.
- YOKOTSUKA, T., ASAO, Y., and SASAKI, M., 1968: Studies on the compounds produced by molds. Part IV. Isolation of non-fluorescent pyrazine compounds (1) (Japanisch). J. Agr. Chem. Soc. Jap. 42, 346-350.
- ZÄHNER, H., 1965: Biologie der Antibiotica. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- ZIJDEN, A.S.M. VAN DER, KOELENSMID, W.A.A.B., BOLDINGH, J., BARRETT, J.C.B., ORD, W.O., and PHILIP, J., 1962: Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey X disease. Nature (Lond.) 195, 1060-1062.

Meiner verehrten Lehrerin, Frau Prof. Dr. B. Gedek, spreche ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit, sowie für die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen meinen aufrichtigen Dank aus.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr danke ich besonders für die mir bereitwillig gewährten Arbeitsmöglichkeiten und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 20. März 1945 wurde ich, Dagmar Irene Kahlau, als Tochter des Hochbauleiters Arthur Kahlau und seiner Ehefrau Antonia, geb. Meižys, in Meißen geboren.

Nach der Einschulung im Herbst 1951 besuchte ich die Volksschule ein Jahr in Lampferding, Kreis Ebersberg, und drei Jahre in Grünwald, Kreis München. Nach anschließender zehnjähriger Schulzeit am Mädchengymnasium der Armen Schulschwestern v.U.L.Fr. am Anger in München legte ich an dieser im Sommer 1965 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1965 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Veterinärmedizin. Ohne Universitätswechsel schloß ich im Herbst 1970 das Studium ab.

Die Approbation erhielt ich mit Wirkung vom 16. Dez. 1970.

In der Zeit vom 25. Nov. 1970 bis 28. Feb. 1972 bearbeitete ich den experimentellen Teil vorliegender Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München, Vorstand Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr.

Seit dem 1. März 1972 bin ich in der Abteilung für Bakteriologie und Mykologie dieses Institutes als wissenschaftliche Mitarbeiterin von Frau Prof. Dr. B. Gedek im Rahmen eines Forschungsauftrages tätig.

